



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Hugo Lopes Bastos

EFEITOS DOS PROCESSOS CULINÁRIOS NA OCORRÊNCIA DE ANTIBIÓTICOS EM BIVALVES

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar orientada pela
Professora Doutora Liliana João Gatões da Silva e coorientada pelo
Professor Doutor André Monteiro Pais Teixeira Pereira e, apresentada
à Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Hugo Lopes Bastos

**EFEITOS DOS PROCESSOS CULINÁRIOS NA OCORRÊNCIA DE
ANTIBIÓTICOS EM BIVALVES**

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar orientada pela Professora Doutora Liliana João Gatões da Silva e coorientada pelo Professor Doutor André Monteiro Pais Teixeira Pereira e, apresentada à Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra

Setembro 2022

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes”
Sir Isaac Newton

Agradecimentos

Este ano de trabalho e escrita da dissertação de mestrado acarretou muitos desafios que só foram ultrapassados devido à ajuda preciosa de várias pessoas a quem agradeço muito.

Quero agradecer ao Professor Doutor André Pereira e à Professora Doutora Liliana Silva por terem aceitado o desafio de serem meus orientadores, por me terem facultado um tema interessante e desafiante. Por me terem ajudado e orientado ao longo de todo o processo.

Quero agradecer ao aluno de mestrado Stefano Compagnoni que esteve comigo e me ajudou na parte experimental da dissertação, sempre de bom humor e com vontade de aprender e ensinar tornando os dias no laboratório muito produtivos e divertidos.

Um agradecimento especial ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) do Pólo de Vairão que realizou a última parte do protocolo experimental, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem*. Para além disso tiveram a amabilidade e disponibilidade de me receber para uma visita às suas instalações.

Um agradecimento muito especial à Raquel Caracitas pela motivação, ajuda em noções de Microsoft Excel e Word, por todo o carinho. No fundo por estar sempre presente quando mais precisei.

Quero também demonstrar toda a minha gratidão a uma pessoa que esteve sempre presente no meu percurso académico e pessoal, o meu irmão Bruno Bastos. Foi provavelmente ele que me fez apaixonar pelo mundo da ciência e pelo querer saber sempre mais. Sempre me apoiou e ajudou com os seus conhecimentos em todos os meus projetos e este não foi diferente. A sua experiência e orientação fez com que conseguisse relativizar os problemas e não ficasse tão nervoso o que me possibilitou concretizar este trabalho.

Os meus pais merecem toda a minha gratidão por sempre me apoiarem e nunca colocarem em causa as minhas ambições ou gostos. Agradeço-lhes muito porque sempre lutaram para me darem uma boa educação e fomentaram em mim uma excelente ética de trabalho. Sem eles esta dissertação não existia.

Um obrigado também à Universidade de Coimbra, onde realizei tanto a minha licenciatura como mestrado, por sempre me ter recebido bem e ter facultado tudo o que necessitava para chegar onde cheguei hoje.

Por fim um muito obrigado a todos os professores, colegas e amigos que estiveram presentes ao longo do meu percurso académico. Sei que todas essas interações e trocas de conhecimentos foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional.

A todos o meu sincero
obrigado!

Resumo

Os antibióticos revolucionaram a medicina veterinária e humana ao possibilitar o tratamento de infecções bacterianas, prevenir doenças e servir como aditivo alimentar no setor pecuário. O consumo de antibióticos aumenta anualmente devido a fatores como o aumento da população mundial e o fácil acesso a medicamentos. Estes, quando consumidos, não são totalmente degradados pelo metabolismo havendo excreção de parte do composto inalterado e seus metabolitos. Assim sendo, estas substâncias são conduzidas para as estações de tratamento de águas residuais (ETARs) que não removem completamente estes medicamentos, levando à contaminação do meio aquático. Os bivalves são organismos filtradores e, por isso, têm a capacidade de acumular contaminantes mesmo que estes estejam presentes em baixas concentrações no meio aquático, como é o caso dos antibióticos. Julga-se que as pequenas concentrações de antibióticos encontradas na natureza não provoquem toxicidade aguda, mas sim toxicidade crônica, levando à promoção de emergência de resistências bacterianas, alterações do comportamento, reprodução e crescimento da fauna e flora aquática. O risco para os consumidores de bivalves reside num efeito direto ou indireto através da potencial resistência antimicrobiana mediada por compostos farmacêuticos. Esse risco tem que ser avaliado tendo em conta que os bivalves normalmente são cozinhados antes de serem consumidos. No entanto, existe pouco conhecimento sobre os efeitos destes tratamentos nos fármacos, nomeadamente em antibióticos.

Assim sendo, o objetivo desta dissertação consistiu em avaliar os efeitos de três tipos de cocção (marinada, vapor e grelhar) na concentração de antibióticos em bivalves fortificados ao nível do limite máximo de resíduos (LMR) e de 2LMR através de uma extração sólido-líquido e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espetrometria de massa em tandem (HPLC-MS/MS).

Segundo os resultados obtidos foi possível constatar que, de modo geral, todos os procedimentos culinários removem parte dos antibióticos adicionados. No entanto, o método mais eficaz é a marinada, seguida da cocção a vapor e, por fim, grelhar. Também se constatou que, de modo geral, o tipo de fortificação, LMR ou 2LMR, não influencia o efeito da cocção na remoção de antibióticos. Verificou-se que diferentes famílias de antibióticos podem comportar-se de maneira diferente no que toca ao efeito que a confeção tem na concentração destes fármacos. Porém, não se pode generalizar os comportamentos tendo em conta apenas a família, uma vez que os resultados mostram grande diversidade de respostas à cocção dentro de cada família. De modo a compreender melhor o comportamento dos antibióticos face à

cocção é necessária mais investigação por forma a descobrir maneiras de mitigar esta problemática.

Palavras-chave: bivalves; antibióticos; resistência antimicrobiana; cocção; HPLC-MS/MS.

Abstract

Antibiotics have revolutionized veterinary and human medicine by making it possible to treat bacterial infections, prevent diseases and serve as a food additive in the livestock sector. The consumption of antibiotics increases annually due to factors such as the growth in the world population and easy access to medicines. These, when consumed, are not completely degraded by metabolism, with part of the unchanged compound and its metabolites being excreted. Therefore, these substances are taken to wastewater treatment plants (WWTPs) that do not completely remove these drugs, leading to contamination of the aquatic environment. Bivalves are filtering organisms and, therefore, have the ability to accumulate contaminants even if they are present at low concentrations in the aquatic environment, as is the case with antibiotics. It is believed that the low concentrations of antibiotics found in nature do not cause acute toxicity, but rather chronic toxicity, leading to bacterial resistance, changes in behavior, reproduction and growth of aquatic fauna and flora. The risk for shellfish consumers lies in a direct or indirect effect through the potential antimicrobial resistance mediated by pharmaceutical compounds. This risk has to be evaluated considering that bivalves are normally cooked before being consumed. However, little is known about the effects of these treatments on pharmaceutical residues, namely antibiotics.

Therefore, the objective of this dissertation was to evaluate the effects of three types of cooking (marinating, steaming, and grilling) on the concentration of antibiotics in bivalves fortified at the level of maximum residue limit (MRL) and 2MRL, through solid-liquid extraction and quantification by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC- MS/MS).

According to the results obtained, it was possible to verify that, in general, all culinary procedures remove part of the added antibiotics. However, the most effective method is marinating, followed by steaming and finally grilling. It was also found that, in general, the type of fortification, LMR or 2LMR, does not influence the effect of cooking on antibiotic removal. It was found that different families of antibiotics may behave differently regarding the effect that cooking has on the concentration of these drugs. However, it is not possible to generalize the behaviors considering only the family, since the results show a great diversity of responses to cooking within each family. To better understand the behavior of antibiotics in relation to cooking, more research is needed to discover ways to mitigate this problem.

Keywords: bivalves; antibiotics; antimicrobial resistance; cooking; HPLC-MS/MS.

Lista de Abreviações

- ARGs - Genes de resistência a antibióticos
- ATC - *Anatomical Therapeutic Chemical (classification)*
- BRA - Bactérias resistentes a antibióticos
- Ca - Cálcio
- CAS - Chemical Abstracts Service
- CECs - Contaminantes de preocupação emergente
- DDD - Dose diária definida
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- EDCs - Disruptores endócrinos e compostos relacionados
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ESI - Ionização por “electrospray”
- ETARs - Estações de Tratamento de Águas Residuais
- EU - União Europeia
- EUA - Estados Unidos da América
- EUMOFA - Observatório europeu do mercado dos produtos da pesca e da aquicultura
- FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
- GC - Cromatografia gasosa
- HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
- INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
- J01 - Antibacterianos para uso sistémico
- LC - Cromatografia líquida
- LMR - Limite máximo de resíduos
- log know - Coeficiente de partição octanol / água
- MDL - Limite de deteção do método
- MQL - Limite mínimo de quantificação
- MS - Espectrometria de massa
- MS/MS - Espectrometria de massa em tandem
- OA - Ácido oxolínico
- OTC - Oxitetraciclina
- PAHs - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
- pka - Constante de dissociação
- PLE - Extração por líquido pressurizado
- QuEChERS - *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

SPE - Extração em fase sólida

TOF - *Time-of-flight*

UHPL -MS/MS- Cromatografia líquida de alto desempenho acoplada à espectrometria de massa triplo quadrupolo

Índice

Introdução	I
Fundamentos teóricos	3
2.1 Origem e destino dos fármacos no meio aquático	3
2.1.1 Antibióticos no meio aquático.....	4
2.2 Bivalves: Caracterização e consumo humano.....	16
2.3 Metodologias analíticas para determinar antibióticos em matrizes biológicas.....	17
2.3.1 Metodologias analíticas desenvolvidas para determinar antibióticos em bivalves.....	17
2.4 Ocorrência de antibióticos em bivalves.....	23
2.5 Toxicidade dos antibióticos para os bivalves e o aparecimento de resistências bacterianas	25
2.6 Avaliação do risco para o Homem através do consumo de Bivalves.....	27
2.7 Efeitos da cocção na ocorrência de antibióticos	28
Parte experimental	31
3.1 Amostragem.....	31
3.2. Materiais e Métodos.....	33
3.2.1 Reagentes e Soluções.....	33
3.2.2 Material e Equipamentos.....	35
3.2.3. Desenho experimental, método de administração dos antibióticos em bivalves e procedimentos de cocção.....	36
3.2.4. Metodologia Analítica	39
3.2.5. Análise e tratamento estatístico.....	41
Resultados e Discussão	43
4.1. Comparação dos diferentes processos de cocção.....	43
4.2. Comparação entre níveis de fortificação.....	45
4.3 Comparação entre famílias de antibióticos.....	46
Conclusão e perspectivas futuras.....	55
Referências Bibliográficas	57
Anexos	63

Lista de Figuras

Figura 1. Consumo de antibacterianos para uso sistémico (grupo ATC J01) no setor comunitário e hospitalar na Europa em 2020. Só constam nesta figura países que comunicaram dados de uso comunitário e hospitalar. Figura adaptada da referência 18.....	13
Figura 2. Percentagem de DDD por 1000 habitantes e por dia em Portugal de antibacterianos, divididos em grupos, consumidas pelos portugueses para uso sistémico (grupo ATC J01) tanto no setor comunitário e hospitalar em 2020. Figura adaptada da referência 18.	14
Figura 3. Disposição das amostras de mexilhão na chapa. Cocção: Grelhar na chapa.	37
Figura 4. Cocção no “Tacho” ou marinada. As nove amostras foram divididas por 2 placas de aquecimento e fervidas durante 2 minutos.....	37
Figura 5. Balão volumétrico com uma placa filtrante numa placa de aquecimento (a); mexilhões colocados em cima da placa filtrante (b) de modo a dar início ao processo de cocção Cozer a Vapor (c).....	37
Figura 6. Anatomia de um mexilhão (Figura adaptada da referência 41).	39
Figura 7- Percentagem da concentração inicial dos antibióticos nas amostras em relação aos três tipos de cocção em estudo.	43
Figura 8. Percentagem da concentração inicial dos antibióticos nas amostras em relação ao tipo de fortificação a que estiveram sujeitas (LMR ou 2LMR).....	46
Figura 9. Percentagem da concentração inicial dos antibióticos nas amostras em relação às famílias de antibióticos em estudo.	47
Figura 10. Percentagem da concentração inicial de macrólidos após os três métodos de cocção.	49
Figura 11. Percentagem da concentração inicial de tetraciclina após os três métodos de cocção.	50
Figura 12. Percentagem da concentração inicial de quinolonas após os três métodos de cocção.	51
Figura 13. Percentagem da concentração inicial das sulfonamidas após os três métodos de cocção.	52

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características físico-químicas dos antibióticos em estudo.....	5
Tabela 2. Compilação de várias metodologias analíticas desenvolvidas para determinar antibióticos em bivalves.	20
Tabela 3. Compilação de valores de ocorrência de antibióticos em bivalves resultantes de vários estudos.....	24
Tabela 4. Número da amostra, lote e peso para as 41 amostras de mexilhão utilizadas nos tratamentos de cocção.....	32
Tabela 5. Antibióticos injetados nos bivalves agrupados por família.	34
Tabela 6. Desenho experimental.	36
Tabela 7. Valores do LMR e 2LMR para cada antibiótico.	38
Tabela 8. Gradiente.....	41
Tabela 9. Notação usada no programa Graphpad Prism 9 relativamente à significância estatística das comparações entre os diferentes grupos de dados.	42

Lista de Anexos

Anexo 1. Pesagens para cada amostra antes e depois da cocção Marinada (bulhão pato), cozer a Vapor e Grelhar na Chapa e o tipo de fortificação que sofreram.....	63
Anexo 2. Valores da percentagem da concentração inicial de todos os antibióticos usados em relação às diferentes fortificações e métodos de cocção.....	64
Anexo 3. Percentagem da concentração inicial de tilosina A após os três métodos de cocção.....	68
Anexo 4. Percentagem da concentração inicial de doxiciclina após os três métodos de cocção	68
Anexo 5. Percentagem da concentração inicial de cinoxacina após os três métodos de cocção.....	69
Anexo 6. Percentagem da concentração inicial de sulfaquinoxalina após os três métodos de cocção	69

Introdução

Os medicamentos são compostos por excipientes, “qualquer componente de um medicamento, que não a substância ativa e o material da embalagem”, e substâncias ativas, “qualquer substância ou mistura de substâncias destinada a ser utilizada no fabrico de um medicamento e que, quando utilizada no seu fabrico, se torna um princípio ativo desse medicamento, destinado a exercer uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica com vista a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas ou a estabelecer um diagnóstico médico”¹.

O consumo de fármacos pelo Homem aumentou consideravelmente nas últimas décadas devido a um conjunto de fatores, sendo eles o crescimento exponencial da população e a evolução da medicina. O constante progresso da ciência permite tratar cada vez mais patologias com recurso a fármacos, o que por sua vez leva a um incremento da esperança média de vida conduzindo inevitavelmente a outras patologias associadas à idade avançada, sendo necessário, mais uma vez, o recurso a fármacos para as tratar. Esta utilização não cresceu só em termos de número mas também em diversidade e na eficiência dos medicamentos².

No entanto, o aumento de consumo de fármacos não foi acompanhado por uma perceção equivalente e consciência de que o uso destes agentes químicos culmina com a sua libertação no ambiente². Isto acontece, principalmente, porque depois do consumo dos fármacos ocorre a sua eliminação do organismo pela urina e fezes. O destino mais comum destas substâncias são as águas residuais, mesmo após o seu tratamento. Devido às propriedades destas substâncias farmacêuticas, nomeadamente a sua estabilidade química, muitos dos procedimentos das Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) são ineficazes na remoção completa dos fármacos³. Assim, estes compostos são também encontrados, em menor quantidade, em águas de superfície e até marinhas².

Uma vez no ambiente aquático, os fármacos, dotados de atividade biológica, podem provocar efeitos tóxicos nos seres vivos, nomeadamente, através da sua interação com estruturas celulares, vias bioquímicas e processos de regulação³. Para além da Saúde Ambiental, também a Saúde Humana pode estar em risco, quer através do consumo contínuo de água contaminada com fármacos⁴, quer pelo consumo de seres vivos aquáticos contaminados. Um desses exemplos é o caso dos bivalves que são consumidos mundialmente. Estes animais permitem a acumulação e a transferência destes contaminantes ao longo da cadeia alimentar, constituindo uma potencial ameaça à Saúde Humana⁵.

Fundamentos teóricos

2.1 Origem e destino dos fármacos no meio aquático

Existem diversas formas através das quais os fármacos chegam ao meio aquático. Podem ter origem no seu descarte direto, no consumo humano e consequente excreção, no tratamento da água e profilaxia em aquacultura, nos tratamentos usados em medicina veterinária e consequente excreção e ainda no tratamento inadequado dos efluentes com origem na indústria farmacêutica ⁶. Contudo é o processo de metabolização e consequente excreção destes compostos pelo organismo a principal via responsável pela presença de fármacos no meio ambiente ⁷.

Os fármacos, quando usados, não são totalmente metabolizados sendo eliminados na urina e fezes como uma mistura do composto original, metabolitos ou conjugados ⁵. Cerca de 64% dos fármacos usados em medicina humana são excretados na urina na forma de composto original ou na forma de metabolitos ⁸. Este facto demonstra que a poluição dos ecossistemas aquáticos não acontece somente pelo fármaco primário, mas por uma mistura de compostos resultantes da metabolização do mesmo.

A metabolização, consiste na alteração da estrutura química dos fármacos (biotransformação) geralmente resultante de um incremento da hidrossolubilidade, que acontece com a finalidade de tornar mais fácil a remoção das substâncias referidas. Após eliminação, estes compostos chegam aos sistemas de tratamentos residuais ².

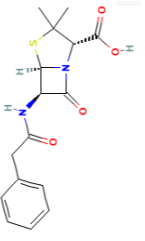
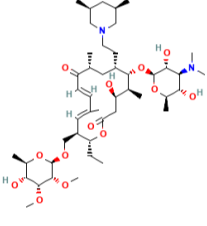
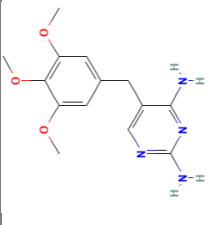
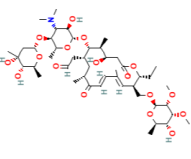
Os antibióticos são os fármacos mais utilizados na medicina, com consumos expressivos em qualquer parte do globo. Por serem quimicamente estáveis, após a sua administração a maior parte do fármaco é excretada de forma inalterada. Sendo que na generalidade as ETARs removem apenas parcialmente estas substâncias ⁹. O que faz com que o uso e libertação dos efluentes de ETARs no meio aquático represente o principal foco de origem de fármacos no ambiente, onde já se registou contaminação na ordem dos ng/L a µg/L

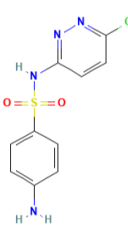
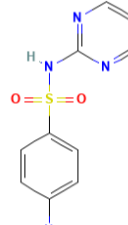
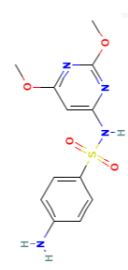
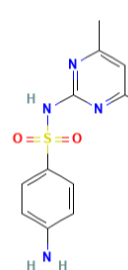
⁵.

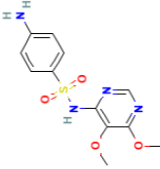
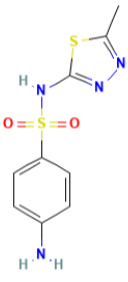
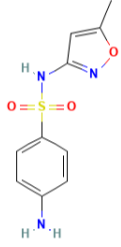
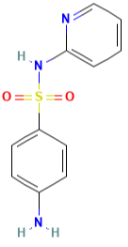
2.1.1 Antibióticos no meio aquático

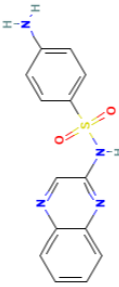
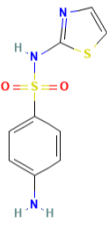
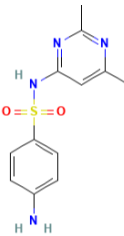
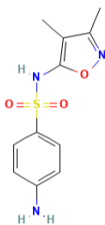
Uma das conquistas científicas mais importantes do século passado foi indiscutivelmente a descoberta dos antibióticos que revolucionou quer a medicina humana quer a veterinária ¹⁰. Os antibióticos são compostos biologicamente ativos que desempenham funções antibacterianas, antifúngicas e antiparasitárias. Têm como objetivos tratar infecções bacterianas tanto em pessoas como em animais, prevenir doenças no setor da pecuária e ainda servir como aditivos alimentares no mesmo setor. Estes compostos podem ser naturais, sintéticos ou semissintéticos. Os antibióticos podem ser agrupados consoante a sua forma de atuar (bactericidas: destroem as bactérias ou bacteriostáticos: impedem o crescimento e desenvolvimento das bactérias) ou pela vertente química do modo como atuam (como sejam quinolonas, tetraciclina, sulfonamidas, e macrólidos) ¹¹. Cada família de antibióticos tem características físico-químicas diferentes como: a solubilidade em água, coeficiente de partição octanol / água ($\log K_{ow}$), constante de dissociação (pK_a) etc. como é mostrado na Tabela I. É por este motivo que os antibióticos se comportam de maneiras distintas quando presentes no meio aquático ¹².

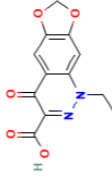
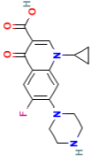
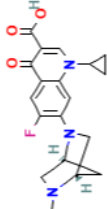
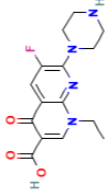
Tabela 1. Características físico-químicas dos antibióticos em estudo.

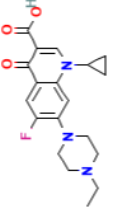
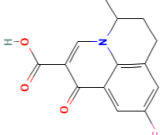
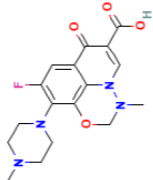
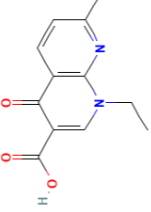
Antibiótico	Número CAS ¹³	Fórmula Molecular ¹³	Peso Molecular ¹³	log Kow ¹³	pKa ¹⁴	Solubilidade (mg/mL) ¹³
Benzilpenicilina	61-33-6	 C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	334.4	1.83	Ácido: 3.53 Base: -2.8	0.21
Tilmicosina	108050-54-0	 C ₄₆ H ₈₀ N ₂ O ₁₃	869.1	3.80	Ácido: 12.55 Base: 10.16	0.000015 (25°C)
Trimetoprim	738-70-5	 C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290.32	0.91	Ácido: 17.33 Base: 7.16	0.4 (25°C)
Tilosina A	1401-69-0	 C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	916.1	1.63	Ácido: 12.45 Base: 7.20	5 (25°C)

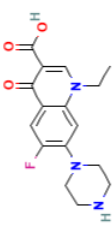
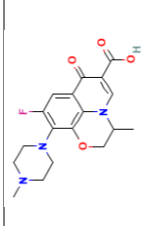
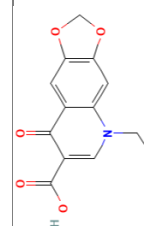
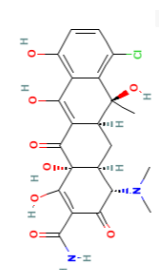
Antibiótico	Número CAS ¹³	Fórmula Molecular ¹³	Peso Molecular ¹³	log Kow ¹³	pKa ¹⁴	Solubilidad (mg/ mL) ¹³
Sulfacoropiridazina	80-32-0	 C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S	284.72	0.898 ¹⁵	Ácido: 6.6 Base: 2.02	0.133 ¹⁴
Sulfadiazina	68-35-9	 C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	250.28	-0.09	Ácido: 6.99 Base: 2.01	0.077 (25°C)
Sulfadimetoxina	112-11-2	 C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310.33	1.63	Ácido: 6.91 Base: 1.99	0.343
Sulfadimidina	57-68-1	 C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	278.33	0.14	Ácido: 6.99 Base: 2	1.5 (29°C)

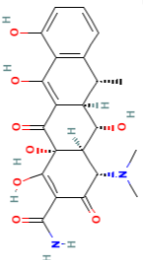
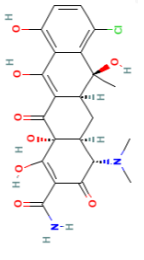
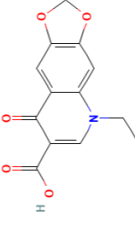
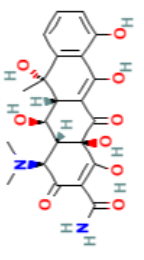
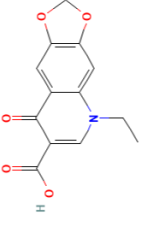
Antibiótico	Número CAS ¹³	Fórmula Molecular ¹³	Peso Molecular ¹³	log Kow ¹³	pKa ¹⁴	Solubilidad (mg/mL) ¹³
Sulfadoxina	2447-57-6	 C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310.33	0.70	Ácido: 6.12 Base: 3.44	0.296 ¹⁴
Sulfametizol	144-82-1	 C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂	270.3	0.54	Ácido: 6.71 Base: 1.95	0.105 (37°C)
Sulfametoxazol	723-46-6	 C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253.28	0.89	Ácido: 6.16 Base: 1.97	0.610 (37°C)
Sulfapiridina	144-83-2	 C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	249.29	0.35	Ácido: 6.24 Base: 2.14	0.268 (25°C)

Antibiótico	Número CAS ¹³	Fórmula Molecular ¹³	Peso Molecular ¹³	log Kow ¹³	pKa ¹⁴	Solubilidad (mg/mL) ¹³
Sulfaquinoxalina	59-40-5	 C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	300.34	1.68	Ácido: 6.79 Base: 2.13	0.0075 (25°C)
Sulfatiazol	72-14-0	 C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	255.3	0.05	Ácido: 6.93 Base: 2.04	0.373 (25°C)
Sulfisomidina	515-64-0	 C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	278.33	-0.33	Ácido: 6.12 Base: 5.0	0.229 ¹⁴
Sulfisoxazol	127-69-5	 C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	267.31	1.01	Ácido: 5.80 Base: 2.17	0.3 (37°C)

Antibiótico	Número CAS ¹³	Fórmula Molecular ¹³	Peso Molecular ¹³	log Kow ¹³	pKa ¹⁴	Solubilidad (mg/ mL) ¹³
Cinoxacina	28657-80-9	 C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O ₅	262.22	1.5	Ácido: 4.93 Base: -4.7	0.961 ¹⁴
Ciprofloxacina	85721-33-1	 C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	331.34	0.28	Ácido: 5.56 Base: 8.77	30 (20°C)
Danofloxacina	112398-08-0	 C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃	357.4	2.27 ¹⁵	Ácido: 5.65 Base: 6.73	0.738 ¹⁴
Enoxacina	74011-58-8	 C ₁₅ H ₁₇ FN ₄ O ₃	320.32	-0.20	Ácido: 5.31 Base: 8.68	3.43

Antibiótico	Número CAS ¹³	Fórmula Molecular ¹³	Peso Molecular ¹³	log Kow ¹³	pKa ¹⁴	Solubilidad (mg/mL) ¹³
Enrofloxacinina	93106-60-6	 C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	359.4	2.471 ¹⁵	Ácido: 5.55 Base: 7.24	0.612 ¹⁴
Flumequina	42835-25-6	 C ₁₄ H ₁₂ FNO ₃	261.25	1.6	Ácido: 5.81 Base: -4.3	2.19 (25°C)
Marbofloxacina	15550-35-1	 C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ O ₄	362.4	0.51 ¹⁵	Ácido: 5.38 Base: 6.16	2.6 ¹⁴
Ácido Nalidíxico	389-08-2	 C ₁₅ H ₁₇ FN ₄ O ₃	232.23	1.41	Ácido: 4.37 Base: 6.06	0.1 (23°C)

Antibiótico	Número CAS ¹³	Fórmula Molecular ¹³	Peso Molecular ¹³	log Kow ¹³	pKa ¹⁴	Solubilidad (mg/ mL) ¹³
Norfloxacina	70458-96-7	 C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	319.33	0.46	Ácido: 5.58 Base: 8.77	0.28 (25°C)
Ofloxacina	82419-36-1	 C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	361.4	-0.39	Ácido: 5.35 Base: 6.72	10.80 (25°C)
Ácido Oxolínico	14698-29-4	 C ₁₃ H ₁₁ NO ₅	261.23	0.94	Ácido: 5.39 Base: -4.30	1.91 ¹⁴
Clorotetraciclina	57-62-5	 C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	478.9	-0.62	Ácido: 2.99 Base: 9.04	0.259 ¹⁴

Antibiótico	Número CAS ¹³	Fórmula Molecular ¹³	Peso Molecular ¹³	log Kow ¹³	pKa ¹⁴	Solubilidad (mg/ mL)
Doxiciclina	564-25-0	 C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	444.4	-0.02	Ácido: 3.27 Base: 8.33	50
Epi-clorotetraciclina	14297-93-9	 C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	478.9	-2.00	4.50 ¹⁶	
Epi-Tetraciclina	79-85-6	 C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	444.4	-1.30	4.8 8.0 9.3 ¹⁶	0.231 (25°C)
Oxitetraciclina	79-57-2	 C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	460.4	-0.90	Ácido: 2.84 Base: 7.41	0.312 (25°C)
Tetraciclina	60-54-8	 C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	444.4	-1.37	Ácido: 3.26 Base: 9.25	0.231 (25°C)

O consumo destes medicamentos a nível mundial tem aumentado continuamente devido, principalmente, a dois fatores: por um lado o aumento da população humana e o fácil acesso generalizado a medicamentos, e por outro, o aumento da procura por proteína animal, que obriga a uma maior produção e a uma maior utilização de antibióticos ¹¹. Desde 2006 que é proibido na União Europeia o uso de antibióticos como promotores de crescimento, no entanto noutras partes do mundo esse uso ainda é permitido ¹⁷.

O consumo de antibacterianos na Europa está representado na Figura 1. Nesta figura pode-se visualizar o consumo destas substâncias em vários países europeus em função da dose diária definida (DDD) por 1000 habitantes e por dia. Portugal assume apenas a décima quinta posição nesta lista, que é encabeçada por Chipre, Grécia e Roménia ¹⁸.

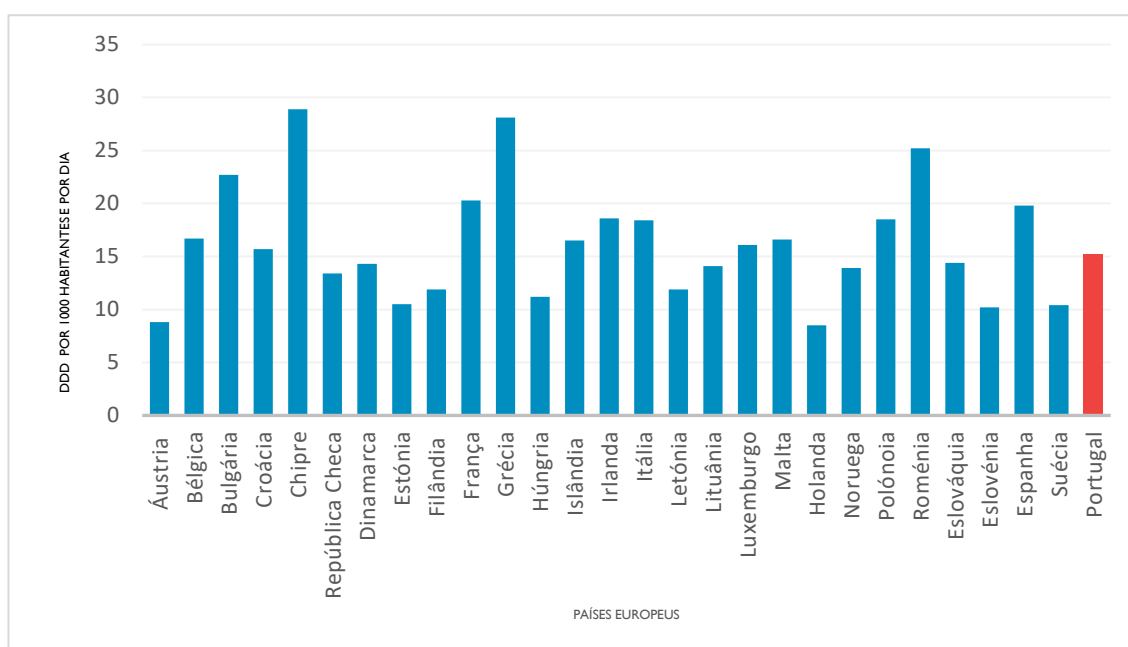


Figura 1. Consumo de antibacterianos para uso sistémico (grupo ATC J01) no setor comunitário e hospitalar na Europa em 2020. Só constam nesta figura países que comunicaram dados de uso comunitário e hospitalar. Figura adaptada da referência 18.

Na figura 2, mostram-se os antibacterianos mais consumidos em Portugal, sendo que as penicilinas se encontram em primeiro lugar por larga vantagem.

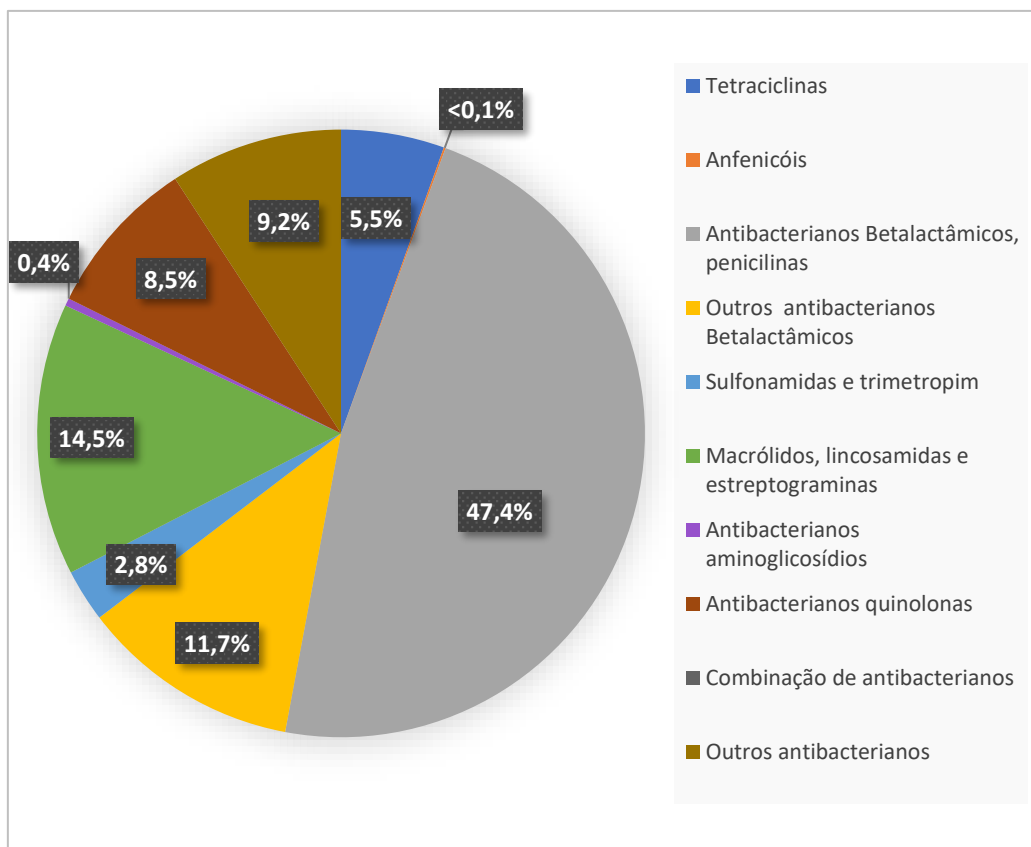


Figura 2. Percentagem de DDD por 1000 habitantes e por dia em Portugal de antibacterianos, divididos em grupos, consumidos pelos portugueses para uso sistêmico (grupo ATC J01) tanto no setor comunitário e hospitalar em 2020. Figura adaptada da referência 18.

O consumo de antibióticos a nível global acontece maioritariamente fora do contexto hospitalar, cerca de 80%. Em 2015, 90% dos antibióticos foram usados fora do contexto hospitalar, sendo que metade deste uso foi para tratamentos de doenças que não eram tratáveis com este tipo de medicamento, como constipações. Este uso desinformado intensifica o problema da resistência bacteriana. Os antibióticos mais usados na Europa, no ano já referido, foram as penicilinas de largo espectro, seguidas dos macrólidos, outros betalactâmicos e quinolonas ¹¹.

A eficácia da metabolização de medicamentos antes da excreção varia bastante, podendo chegar a menos de 10% ou atingir mais de 90%. Porém, no caso de uso em grande quantidade de um dado antibiótico, mesmo que este seja bastante metabolizado, pode vir a ser detetado o composto original em concentrações significativas nos efluentes das ETARs. Cerca de 70 a 80% dos antibióticos entram nos sistemas de águas residuais na sua forma original. A principal origem dos antibióticos são os efluentes domésticos (cerca de 75% na Europa e nos EUA) e hospitalares (5% e 20%). Na generalidade os hospitais não estão diretamente ligados a ETARs estando ligados ao sistema de esgotos urbanos ¹¹ que conduzem às ETARs. Aqui os antibióticos e seus metabolitos podem sofrer biodegradação ou adsorção

pelas lamas, cuja função é a remoção de substâncias indesejadas, como é o caso dos antibióticos ou não sofrer qualquer alteração, culminando com a sua passagem para o seu efluente ¹².

Os métodos de tratamento aplicados não parecem ser completamente eficientes a remover estes fármacos. Estudos anteriores permitiram concluir que a taxa de remoção da eritromicina foi inferior a 5% e que as taxas de remoção de tetraciclina, sulfonamidas e fluoroquinolonas variaram entre 30% e 80%. Isto acontece pelo facto destes compostos serem pouco biodegradáveis e a sedimentação secundária das lamas ativadas na maioria das ETARs parecer ser ineficiente. Assim sendo, acaba por ocorrer a transferência de antibióticos para os cursos de água adjacentes. As ETARs são então vistas como a principal fonte da contaminação de águas superficiais por antibióticos ¹¹.

Apesar disso, ainda não existe regulamentação europeia ou americana com vista a implementar limites para concentrações de antibióticos em efluentes de ETARs ¹¹. A nível europeu existe uma lista de vigilância, ao abrigo da Diretiva Quadro da Água, que abrange certos poluentes, incluindo antibióticos, que devem ser monitorizados regularmente em águas superficiais. Nesta lista constam por exemplo a amoxicilina, a ciprofloxacina e o sulfametoxazol ¹².

Segundo a literatura existente, as maiores concentrações de antibióticos em amostras de águas ambientais já registadas foram de enrofloxacin, norfloxacin, sulfametoxazol, trimetoprim, azitromicina, eritromicina, clorotetraciclina e oxitetraciclina (todas superiores a 1 µg/l). Já em efluentes de ETARs as concentrações mais elevadas encontradas foram de ofloxacin, claritromicina e amoxicilina (todas superiores a 1 µg/l) ¹⁷.

Existem vários fatores que podem influenciar o comportamento e destino dos antibióticos aquando da sua presença no meio aquático como as características físico químicas dos antibióticos e as condições do meio (nomeadamente o pH da água e a composição do solo). No entanto, não é fácil prever o comportamento dos antibióticos no meio, dado que estes se podem degradar, metabolizar ou transformar, o que reforça a ideia de que não se deve focar a investigação desta problemática unicamente nos antibióticos como composto original, mas também nos seus metabolitos ¹².

2.2 Bivalves: Caracterização e consumo humano

Pertencentes ao fillo *Mollusca*, os bivalves (classe *Bivalvia*) englobam os animais cujo corpo está protegido por uma concha com duas valvas (exemplos: mexilhão e ostra) ¹⁹.

Os bivalves são uma classe de organismos que tem uma ampla distribuição geográfica sendo encontrados em águas salgadas, doces e salobras. Estes organismos são muito sensíveis a xenóbioticos (ex. fármacos) na água, uma vez que respiram e se alimentam através da filtração de grandes quantidades de água ⁵. Por exemplo, o mexilhão azul filtra em média 1.8 litros de água por hora ²⁰. Assim, estes organismos podem bioacumular contaminantes, mesmo que estes estejam presentes em baixas concentrações no meio como é o caso dos fármacos e seus metabolitos.

Estes organismos são assim considerados excelentes bioindicadores, permitindo avaliar as modificações que ocorrem no meio onde se encontram. Para além disso, são animais facilmente colhidos e manipulados em laboratório e ainda possuem grande importância ecológica e socioeconómica. Por estas razões os bivalves são muito usados em toxicologia e programas de monitorização ambiental, oferecendo informações acerca do bem-estar destes animais, dos níveis de contaminação do meio onde habitam e ainda do perigo para o Homem inerente à sua ingestão ^{3; 21}.

Os bivalves são um alimento com grande relevância gastronómica em Portugal devido ao facto de fazerem parte de inúmeros pratos tradicionais de certas regiões do país ²². Este alimento é muito consumido ao longo do ano, porém com maior ênfase no verão ²³. Em 2019, a produção de bivalves em Portugal traduziu-se em quase metade da produção total em aquacultura (45%), o que demonstra uma valorização deste produto e o grande interesse socioeconómico pelo mesmo ²⁴. Em 2020, mais de 16 000 toneladas de moluscos foram apanhadas na costa portuguesa ²³. Os dados da Balança Alimentar Portuguesa 2016-2020 mostram que houve um aumento do consumo de crustáceos e moluscos de 18,1% para 24,1%. As três espécies de bivalves mais consumidas em Portugal são a Amêijoa-boia (*Ruditapes decussatus*), o Mexilhão (*Mytilus spp.*) e a Ostra (*Crassostrea spp.*) ²⁵.

Portugal, em 2019, continuou a ser o maior consumidor de pescado e produtos de aquacultura na união europeia, segundo dados da EUMOFA. Isto apesar de uma pequena diminuição de consumo em 2018 devido à diminuição de importação e aumento da exportação. Portugal tem um consumo médio de 59,91kg per capita por ano. O que aufere mais do dobro do consumo médio dos restantes países da união europeia que se fixa nos 23,97kg ²⁶. Os países que consomem mais bivalves per capita na União Europeia são os do Sul: Espanha, França, Portugal, Itália e Grécia. Portugal tem um consumo de cerca de 2,5kg per

capita por ano ²⁷. Os dados de consumo de bivalves em Portugal e no mundo são bastante escassos, mas para se ter ideia do consumo podemos olhar para o valor de consumo de mexilhões na união europeia que é de 1,23 kg per capita. Os mexilhões são das espécies mais consumidas na União Europeia e é das poucas em que a União Europeia tem alto nível de autossuficiência. Cerca de 80% do consumo é fornecido internamente. Isto é sobretudo possível pela produção de aquacultura em Espanha ²⁶.

Para além da importância socioeconómica e cultural, o consumo de bivalves também se revela benéfico para a saúde. Os bivalves são um reservatório de nutrientes essenciais, de grandes quantidades de proteína, de baixo teor de ácidos gordos saturados e ainda são fonte importante de micronutrientes como as vitaminas ²⁵. O consumo de bivalves ainda promove o desenvolvimento cognitivo, a visão e ajuda a prevenir doenças cardíacas ²⁸.

2.3 Metodologias analíticas para determinar antibióticos em matrizes biológicas

As matrizes biológicas devido à sua complexidade exigem geralmente um tempo de preparação das amostras longo. São várias as técnicas de extração usadas. Como por exemplo a extração rotativa, extração micelar assistida por micro-ondas e extração por líquido pressurizado (PLE). É comum depois destas técnicas de extração proceder-se à extração em fase sólida (SPE) como uma fase de limpeza e concentração posterior. Alternativamente à SPE pode-se usar a técnica QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*).

Com o intuito de averiguar a presença de fármacos nas amostras as técnicas a que mais se recorre são: a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC) acoplada à espectrometria de massa (MS) ou espectrometria de massa em tandem (MS / MS). Estas técnicas são normalmente as escolhidas devido à sua seletividade, especificidade e sensibilidade ²⁹. Tais características são imprescindíveis à identificação e quantificação de compostos farmacêuticos em baixas concentrações nas amostras biológicas. Vários métodos foram desenvolvidos para determinar fármacos em bivalves.

2.3.1 Metodologias analíticas desenvolvidas para determinar antibióticos em bivalves

Em 2015, foi desenvolvido e validado um método analítico que permite determinar simultaneamente 23 fármacos e alguns dos seus principais metabolitos em 3 espécies de bivalves. São elas a ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*), o mexilhão do Mediterrâneo (*Mytilus galloprovincialis*) e o pé-de-burrinho (*Chamelea gallina*). Os compostos passíveis de serem

determinados por esta técnica são particularmente importantes por se encontrarem nos tratamentos terapêuticos mais usados, como sejam drogas psiquiátricas, calmantes, analgésicos/ anti-inflamatórios, fármacos responsáveis por bloquear os canais de cálcio, diuréticos, medicamentos para o tratamento da hiperplasia prostática e antibióticos nomeadamente ronidazol, metronidazol, dimetridazol, sulfametoxazol, N-acetil-sulfametoxazol, azitromicina e eritromicina. A metodologia em causa consiste na extração com líquido pressurizado (PLE) seguida por uma limpeza de extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa triplo quadrupolo (*ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*) (UHPL-MS/MS) para identificar e quantificar os compostos alvo em concentrações baixas na ordem dos ng/g. Os valores dos limites de deteção do método (MDL) para os antibióticos variaram entre 0.01 ng/g para o ronidazol na ostra do pacífico e 0.80 ng/g para o metronidazol no Pé-de-burrinho. Já os valores do limite mínimo de quantificação (MQL) variaram entre 0.02 ng/g para a azitromicina na ostra do pacífico e 3.70 ng/g para a eritromicina no mexilhão do mediterrâneo (Tabela 2). Esta técnica pode ser caracterizada como sendo rápida, simples e robusta ³⁰.

Noutro estudo investigou-se as concentrações de fármacos (inclusive de antibióticos como por exemplo: azitromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, claritromicina, dimetridazol, eritromicina, metronidazol, N-acetil-sulfametoxazol, ofloxacina, ronidazol e sulfametoxazol) e disruptores endócrinos e compostos relacionados (EDCs) em alimentos provenientes do mar, oriundos de áreas potencialmente poluídas na europa. Analisaram-se vários alimentos inclusive bivalves. Os bivalves estudados foram o mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*), o pé-de-burrinho (*Chamalea gallina*) e a ostra do pacífico (*Crassostrea gigas*) que foram colhidos no delta do rio Ebro, uma zona de aquacultura. Os mexilhões foram colhidos na baía de El Fangar. As ameijoas e as ostras na baía dos Alfaques. O mexilhão do atlântico (*Mytilus spp.*) também foi estudado e foi colhido do estuário do rio Tejo, do delta do Pó e do delta do Ebro. Estes locais foram escolhidos por estarem referenciados como zonas poluídas com causas conhecidas como indústria, agricultura, descargas de efluentes domésticos etc. Os bivalves foram extraídos através de PLE e o método de purificação usado foi SPE. A deteção e quantificação dos compostos, inclusive dos antibióticos, nos bivalves foi levada a cabo usando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa triplo quadruplo (Tabela 2)³¹.

Num outro estudo foi apresentado um método para determinação de fármacos em bivalves (*Mytilus spp.*), e ainda uma investigação acerca dos efeitos de cozer a vapor nos níveis dos fármacos em mexilhões. Dentro dos fármacos selecionados para esta experiência encontrava-se um antibiótico, o trimetoprim. Os mexilhões foram expostos diretamente aos fármacos por injeção ou através de exposição com água do mar contaminada com os fármacos

durante 4 dias. Para a extração dos fármacos dos mexilhões usou-se a PLE, posteriormente realizou-se a SPE e por fim de modo a determinar e quantificar os resíduos farmacêuticos procedeu-se a uma LC-MS/MS. O limite mínimo de quantificação do método para o trimetoprim no mexilhão foi de 4 ng/g (Tabela 2) ²⁰.

Tabela 2. Compilação de várias metodologias analíticas desenvolvidas para determinar antibióticos em bivalves.

Espécie	Grupos Farmacológicos	Antibióticos	Preparação da Amostra		Método Analítico	MDL (ng/g)	MQL (ng/g)	Referência
			Método de Extração	Método de Purificação				
Ostra do pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>)		Ronidazol	PLE	SPE	UHPL-MS/MS	0.01	0.03	D. Alvarez-Muñoz et al. ³⁰
		Metronidazol				0.15	0.50	
		Dimetridazol				0.21	0.71	
		Sulfametoxazol				0.03	0.09	
		N-acetil-sulfametoxazol				0.02	0.06	
		Azitromicina				0.01	0.02	
		Eritromicina				0.01	0.04	
		Ronidazol				0.10	0.33	
		Metronidazol				0.30	1.01	
		Dimetridazol				0.05	0.15	
Mexilhão do Mediterrâneo (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	23 fármacos de 8 grupos terapêuticos, incluindo drogas psiquiátricas, analgésicos, antibióticos etc.	Sulfametoxazol	PLE	SPE	UHPL-MS/MS	0.01	0.02	D. Alvarez-Muñoz et al. ³⁰
		N-acetil-sulfametoxazol				0.04	0.12	
		Azitromicina				0.01	0.02	
		Eritromicina				1.11	3.70	
		Ronidazol				0.06	0.20	
		Metronidazol				0.80	2.66	
		Dimetridazol				0.32	1.07	
		Sulfametoxazol				0.02	0.06	
		N-acetil-sulfametoxazol				0.06	0.18	
		Azitromicina				0.01	0.03	
Pé-de-burrinho (<i>Chamelea gallina</i>)		Eritromicina				0.18	0.60	

Espécie	Grupos Farmacológicos	Antibióticos	Preparação da Amostra		Método Analítico	MDL (ng/g)	MQL (ng/g)	Referência
			Método de Extração	Método de Purificação				
Mexilhão (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)		Azitromicina	PLE	SPE	HPLC-MS/MS triplo-quadrupolo	-	-	D. Alvarez-Muñoz et al. ³¹
		Cloranfenicol				-	-	
		Ciprofloxacina				-	-	
		Clarithromicina				-	-	
		Dimetridazol				-	-	
		Eritromicina				-	-	
		Metronidazol				-	-	
		N-acetil-sulfametoxazol				-	-	
		Ofloxacina				-	-	
		Ronidazol				-	-	
		Sulfametoxazol				-	-	
		Azitromicina				-	-	
		Cloranfenicol				-	-	
		Ciprofloxacina				-	-	
		Clarithromicina				-	-	
		Dimetridazol				-	-	
		Eritromicina				-	-	
		Metronidazol				-	-	
		N-acetil-sulfametoxazol				-	-	
		Ofloxacina				-	-	
Ronidazol	-	-						
Sulfametoxazol	-	-						
Azitromicina	-	-						
Cloranfenicol	-	-						
Ciprofloxacina	-	-						
Clarithromicina	-	-						
Dimetridazol	-	-						
Eritromicina	-	-						
Metronidazol	-	-						
N-acetil-sulfametoxazol	-	-						
Ofloxacina	-	-						
Ronidazol	-	-						
Pé-de-burrinho (<i>Chamaea gallina</i>)	51 fármacos, incluindo drogas psiquiátricas, antibióticos, diuréticos, analgésicos etc.		PLE	SPE	HPLC-MS/MS triplo-quadrupolo	-	-	D. Alvarez-Muñoz et al. ³¹
						-	-	
Ostra do pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>)								
Mexilhão do Atlântico (<i>Mytilus spp.</i>)								

Espécie	Grupos Farmacológicos	Antibióticos	Preparação da Amostra		Método Analítico	MDL (ng/g)	MQL (ng/g)	Referência
			Método de Extração	Método de Purificação				
Mexilhão-azul (<i>Mytilus edulis</i>)	5 fármacos, incluindo, 1 antibiótico, 2 NSAIDs, 1 antiepiléptico e 1 regulador lipídico.	Trimetoprim	PLE	SPE	LC-MS/MS	-	4	McEneff et al. ²⁰

MDL- limite mínimo de detecção; MQL- limite mínimo de quantificação.

2.4 Ocorrência de antibióticos em bivalves

A grande maioria dos grupos de fármacos já foi encontrada no meio ambiente, porém os mais relevantes, por serem os mais detetados, são os antibióticos, os anticonvulsivantes, os antipiréticos, os citostáticos e as hormonas ⁶. Como anteriormente referido muitas são as fontes que os podem levar até ao meio aquático e conseqüentemente aos bivalves. Devido à capacidade filtradora destes animais muitos foram os fármacos e metabolitos correspondentes que foram detetados nesta classe do filo *Mollusca* em diversos estudos realizados.

Alvarez-Munoz *et al.* ³⁰ detetaram 15 compostos farmacêuticos (em níveis acima dos limites de deteção do método) distribuídos pelas 3 espécies de bivalves oriundas do delta do rio Ebro. Os compostos detetados incluíam, entre outros, 3 antibióticos, nomeadamente ronidazol, sulfametazaxol e azitromicina, em níveis que variaram entre valores menores que o limite de quantificação do método como no caso do sulfametazaxol na espécie *Crossastrea gigas* e 3.0 ± 0.1 ng/g de azitromicina na espécie *Crossastrea gigas* ³⁰ (Tabela 3).

Noutro estudo, realizado em diferentes áreas da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), os resultados mostram que não existe uma presença significativa de antibióticos nas áreas estudadas, sendo que os níveis variaram entre 0.55 ng/g de tetraciclina no mexilhão colhido na Espanha Atlântica e 125.03 ng/g de oxitetraciclina em ameijoia oriunda do mar Adriático do Norte (Tabela 3). Esta última foi a única amostra que continha uma concentração ligeiramente superior ao limite máximo de resíduos da União Europeia estabelecido para os peixes ³².

No estudo, “*Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe*” foram detetados em bivalves 4 dos 7 antibióticos incluídos no método usado. Foram eles a azitromicina, dimetridazol, sulfametoxazol e ronidazol, que foram detetados em concentrações que variaram entre valores menores que o limite de quantificação do método como no caso do dimetridazol detetado na espécie *Crossastrea gigas* oriunda do delta do rio Ebro e 13.3 ng/g de azitromicina na espécie *Mytilus spp.* colhida no delta do Pó (Tabela 3). De destacar a azitromicina que foi detetada em todas as amostras acima do limite mínimo de quantificação ³¹.

Tabela 3. Compilação de valores de ocorrência de antibióticos em bivalves resultantes de vários estudos.

Antibióticos	Espécie	Concentração média (ng/g)	Local	Referência
Ronidazol	<i>Crossastrea gigas</i>	1.8 ± 0.9	Rio Ebro	Alvarez-Muñoz et al. ³⁰ (Valores expressos em peso seco)
Sulfametazaxol		<MQL		
Azitromicina		3.0 ± 0.1		
Ronidazol	<i>Chametea gallina</i>	1.0 ± 0.7		
Sulfametazaxol		< MQL		
Azitromicina		1.2 ± 0.1		
Ronidazol	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	< MDL		
Sulfametazaxol		< MDL		
Azitromicina		2.9 ± 0.2		
Tetraciclina	Mexilhão	0.55	Espanha Atlântica	L. Maria Chiesa et al. ³² (Valores em peso molhado obtidos em mexilhão fresco)
	Ameijoa	49.45	Mar Adriático do Norte	
Oxitetraciclina	Ameijoa	125.03		
Doxiciclina	Ameijoa	60.45		
Clorotetraciclina	Ameijoa	77.48		
Flumequina	Mexilhão	3.59		
	Ameijoa	0.84		
Azitromicina	<i>Crossastrea gigas</i>	≅ 3	Delta do Ebro	Alvarez-Muñoz et al. ³¹ (Valores expressos em peso seco)
	<i>Chametea gallina</i>	1.3	Delta do Ebro	
	<i>Mytilus spp.</i>	≅ 3	Delta do Ebro	
		11.8	Estuário do Tejo	
	13.3	Delta do Pó		
Dimetridazol	<i>Crossastrea gigas</i>	< MQL	Delta do Ebro	
	<i>Chametea gallina</i>	< MQL	Delta do Ebro	
	<i>Mytilus spp.</i>	< MQL	Delta do Ebro	
		7.7	Estuário do Tejo	
	< MQL	Delta do Pó		
Sulfametoxazol	<i>Crossastrea gigas</i>	< MQL	Delta do Ebro	
	<i>Chametea gallina</i>		Delta do Ebro	
	<i>Mytilus spp.</i>		Estuário do Tejo Delta do Pó	
Ronidazol	<i>Crossastrea gigas</i>	≅ 2	Delta do Ebro	
	<i>Chametea gallina</i>	≅ 1	Delta do Ebro	
	<i>Mytilus spp.</i>	< MQL	Delta do Ebro Estuário do Tejo Delta do Pó	

MDL- limite mínimo de deteção; MQL- limite mínimo de quantificação.

2.5 Toxicidade dos antibióticos para os bivalves e o aparecimento de resistências bacterianas

Os fármacos são compostos químicos pensados para atuar com o propósito de alterar funções biológicas com fins terapêuticos e por isso possuem certas características que os tornam particularmente problemáticos para os ecossistemas e para o Homem. Características como: a sua alta biodisponibilidade (sempre aptos a executar a sua atividade biológica); a sua elevada potência farmacológica (baixas concentrações produzem efeitos visíveis); o facto de normalmente serem lipofílicos (confere a vantagem de atravessar membranas biológicas e desta forma serem absorvidos pelo organismo mais eficazmente); e ainda o facto de possuírem resistência à biotransformação (para poderem atuar no organismo tempo suficiente para exercer a sua atividade terapêutica antes de serem eliminados através de urina ou fezes) torna-os resistentes a alguns fenómenos de degradação da natureza ². Daí os fármacos serem já classificados como contaminantes emergentes problemáticos (CECs) devido à sua pseudo persistência no ambiente aquático ²⁰.

A maioria das investigações realizadas até ao momento não consegue comprovar a existência de efeitos tóxicos para o Homem relacionados com a presença de compostos farmacêuticos no ambiente aquático. Porém, há cada vez mais dados que apontam para a ocorrência de efeitos tóxicos para os seres vivos que habitam no meio aquático. Todavia os efeitos detetados são na sua maioria pouco claros e difíceis de associar à presença de resíduos farmacêuticos no meio ambiente. Como estes resíduos estão geralmente presentes em concentrações baixas nos sistemas aquáticos considera-se mais provável que provoquem efeitos tóxicos crónicos nos organismos (mudanças ligeiras nos organismos ao longo do tempo) e não efeitos agudos. Os efeitos crónicos de uma exposição continuada a estes compostos irão traduzir-se em mudanças ligeiras nos organismos ao longo do tempo o que poderá levar a confundir estes efeitos tóxicos com tendências evolutivas. Alterações endócrinas, indução/inibição de enzimas ou alteração de vias de sinalização, são alguns dos efeitos que podem advir da presença de fármacos no ambiente aquático. No geral estas modificações não ameaçam a sobrevivência dos organismos a curto prazo ³³.

O uso dos antibióticos, quer por humanos quer por animais, leva a que parte desses compostos cheguem ao meio aquático em concentrações que podem atingir níveis que variam entre ng/L a µg/L. Pensa-se que estas concentrações não provocam toxicidade aguda, mas sim toxicidade crónica, dado que os organismos aquáticos estão em contacto com estes contaminantes durante todo o seu ciclo de vida. Estas baixas concentrações de antibióticos no meio aquático podem provocar alterações no comportamento, reprodução e crescimento

da fauna e flora aquática. No entanto, até à data, a maioria das investigações debruçaram-se sobre a toxicidade aguda provocada por altas doses e não sobre efeitos provocados por baixas concentrações de antibióticos ¹¹. Os organismos que aparentam ser mais afetados são os procariotas, visto que os antibióticos promovem a inibição do crescimento bacteriano. Um grupo de procariotas crucial para o bom funcionamento dos ecossistemas aquáticos são as cianobactérias. Este grupo é responsável por grande parte da fixação de dióxido de carbono e por uma grande percentagem da produção de oxigénio livre quer em ecossistemas terrestres quer marinhos e algumas espécies deste grupo têm também a capacidade de fixar azoto atmosférico. As cianobactérias ainda representam a maioria da massa de fitoplâncton ¹⁷.

A biodiversidade microbiana tem um papel crucial na manutenção de processos biológicos na água e no solo, incluindo os ciclos biogeoquímicos. É sabido que os antibióticos podem atuar como bactericidas ou bacteriostáticos, podendo provocar a extinção de certas populações microbianas fulcrais para o bom funcionamento do ecossistema aquático. Assim sendo, no meio aquático, os antibióticos podem alterar funções ecológicas como modificar a transformação do azoto, metanogénese, redução de sulfato, o ciclo de nutrientes e degradação da matéria orgânica.

É importante referir que a resistência aos antibióticos por parte de microrganismos é um fenómeno natural ¹⁰, no entanto os resíduos de antibióticos no meio aquático podem contribuir para acelerar a evolução de bactérias resistentes a antibióticos (BRA) e genes de resistência a antibióticos (ARGs) no ambiente. Os riscos associados ao resistoma (conjunto de genes associados à resistência das bactérias aos antimicrobianos, presentes em um determinado ambiente) prendem-se com a potencial transmissão de BRA e ARGs ambientais para humanos. Desta forma é facilmente perceptível que os antibióticos representam um problema de saúde pública devido à exposição persistente a antibióticos no meio que resultam em resistência a medicamentos antibacterianos ¹¹. A pressão seletiva e constante sobre certas bactérias por diferentes antibióticos resultou em superbactérias (bactérias patogénicas resistentes a múltiplos antibióticos) que provocam infeções intratáveis. Este é um problema em constante crescimento no mundo e um fator que ajuda à sua disseminação é a globalização dos transportes. No entanto são os países em desenvolvimento os mais afetados por possuírem piores condições médicas, sociais e económicas ¹⁰. As doenças resistentes a medicamentos já provocam cerca de 700 000 mortes no mundo por ano, no entanto previsões apontam para que esse número possa aumentar exponencialmente, sendo que se nada for feito poderão morrer 10 milhões de pessoas a cada ano quando chegarmos a 2050 ¹². Se nada for feito para contrariar este fenómeno estaremos a caminhar em direção a um período anterior aos antibióticos em que doenças infecciosas comuns e facilmente tratáveis hoje em dia

eram responsáveis pela morte de milhões de animais e pessoas ¹⁰. Este problema é de tal ordem grave e preocupante que a organização mundial da saúde reconheceu a ocorrência de BRA e ARGs como uma das mais importantes preocupações de saúde pública deste século ¹¹. Para tentar combater este problema foi recentemente implementado o regulamento (UE) 2019/6, relativo aos medicamentos veterinários e que revoga a Diretiva 2001/82/CE. Este regulamento está em vigor desde 28 de janeiro de 2022. Tem como objetivos tornar a legislação mais atual, promover a inovação e a disponibilidade de medicamentos veterinários e ainda o grande objetivo de combater a resistência antimicrobiana. Para isso esta legislação impõe medidas que visam a venda, o fabrico, a importação, a exportação o fornecimento, a distribuição, o controlo e a utilização de medicamentos veterinários. O artigo 107º é de particular interesse pois indica as restrições ao uso de medicamentos antimicrobianos que têm como propósito combater a resistência antimicrobiana. Medidas como a proibição do uso destes para efeitos de crescimento ou para combater a falta de higiene animal ³⁴.

Um efeito concreto dos antibióticos em bivalves foi averiguado no estudo “Immunotoxic Potential Effects of Selected Psychotropic Drugs and Antibiotics on Blue Mussel” que teve como objetivo investigar a potencial genotoxicidade e imunotoxicidade de fármacos, incluindo antibióticos, em bivalves *Mytilus edulis*. Para isso os hemócitos do mexilhão foram expostos aos fármacos, inclusive a 3 antibióticos: sulfametoxazol, trimetoprim e eritromicina em concentrações que variaram entre µg/L a mg/L. Nesta investigação pode-se constatar no caso dos antibióticos que o trimetoprim teve comportamento genotóxico a 200 µg/L e imunotóxico a 20 mg/L. A eritromicina provocou efeitos semelhantes, porém a concentrações mais elevadas. A exposição ao sulfametoxazol resultou em stress oxidativo. Com estes resultados os autores concluíram que o metabolismo do DNA e o sistema imunológico dos bivalves são sensíveis à presença de antibióticos ³⁵.

2.6 Avaliação do risco para o Homem através do consumo de Bivalves

O enorme uso de antibióticos aliado à alta percentagem dos mesmos que podem ser excretados sem estarem sujeitos à ação do metabolismo (até 90%) culmina com a sua presença generalizada no meio ambiente ⁷. O risco para os consumidores devido à existência de compostos farmacêuticos na água de consumo ou no marisco, nomeadamente em bivalves, pode traduzir-se por meio de um efeito direto ou indireto através da potencial resistência antimicrobiana mediada por compostos farmacêuticos ²⁰.

Posto isto é facilmente perceptível a importância de investigar o risco potencial de seres vivos aquáticos bioacumularem fármacos e seus metabolitos. Adicionalmente percebe-se a

importância de indagar que efeitos provocam os tratamentos culinários nos compostos referidos (se os aumentam ou diminuem para valores insignificantes) quando presentes em marisco (nomeadamente bivalves) ²⁰.

Pode-se afirmar que a probabilidade de exposição a resíduos farmacêuticos para o Homem através da cadeia alimentar é real. Porém carece de estudos de avaliação de risco da exposição destes compostos em organismos aquáticos e humanos o que impossibilita uma avaliação do risco de exposição real atual ²⁰.

2.7 Efeitos da cocção na ocorrência de antibióticos

Os potenciais efeitos no Homem provocados pelo consumo de bivalves contaminados com fármacos têm de ser investigados tendo em conta que grande parte do marisco fresco passa por tratamentos culinários antes de ser consumido. No entanto pouco ainda se sabe sobre os efeitos destes tratamentos nos resíduos farmacêuticos. Um estudos feito em peixes demonstrou que certos antibióticos veterinários são pouco degradados durante os tratamentos culinários e migram entre tecidos ³⁶. Noutros estudos tentou-se averiguar o efeito de vários procedimentos culinários em resíduos de antibióticos em crustáceos e observou-se também uma remoção insuficiente dos resíduos (20% e 60% no músculo e na concha respetivamente) ²⁰.

Uma outra investigação teve como objetivos perceber qual o efeito de tratamentos culinários nas concentrações de fármacos, incluindo antibióticos, e disruptores endócrinos presentes em alimentos provenientes do mar, inclusive bivalves, disponíveis no mercado da União Europeia, bem como avaliar o grau de exposição humana através da ingestão deste tipo de alimentos. As amostras foram recolhidas em duas campanhas distintas. Uma no outono de 2014 e outra na primavera de 2015, a que os autores se referem como *1st round* e *2nd round* respetivamente. Os resultados revelaram que as amostras que sofreram cozedura a vapor possuíam concentrações de fármacos abaixo dos níveis de deteção do método (MDL) ou abaixo dos níveis de quantificação do método (MQL) ³⁷.

Assim sendo, não foi possível observar um efeito na concentração dos fármacos devido ao tratamento culinário usado (cozedura a vapor). Os resultados mostraram que na maioria dos alimentos marinhos comercializados na União Europeia não é possível detetar fármacos ou que estes se encontram em concentrações abaixo do limite de quantificação do método. Assim sendo os autores deste artigo científico concluíram que não existe um potencial risco para a saúde humana no que toca à ingestão de produtos de origem marinha comercializados na União Europeia em relação a estes contaminantes ³⁷.

Já num dos poucos trabalhos existentes acerca desta temática tentou-se perceber então o efeito da cozedura nos valores de medicamentos em mexilhões. Estes foram expostos a concentrações muito superiores às detetadas na natureza (cerca de 1000 vezes mais que em águas de superfície marinhas). Nesta experiência (cozedura a vapor de mexilhões) pode-se constatar um aumento generalizado de resíduos farmacêuticos no tecido contaminado do mexilhão e na água de cozedura. Os aumentos observados na concentração de diclofenac, gemfibrozil e ácido mefenâmico nos mexilhões cozidos podem ser resultado da reconversão de acil-glicuronídeo no composto original após o tratamento culinário referido. Com exceção de um fármaco o trimetoprim, um antibiótico, onde foram encontradas concentrações maiores em mexilhões antes de estes serem cozinhados. Foi observada uma redução de cerca de 23% deste antibiótico após a cozedura a vapor. No entanto, tais resultados implicam mais estudos ²⁰.

Este resultado de redução da concentração deste antibiótico nos mexilhões após o tratamento culinário está em concordância com os resultados para outros antibióticos noutros estudos semelhantes. Como é o caso da oxitetraciclina (OTC) e do ácido oxolínico (OA), que também sofreram uma redução dos seus níveis de concentração no músculo de camarão após tratamentos culinários ²⁰.

No estudo referente à OTC registou-se que a fritura e fervura eram os tratamentos mais eficazes. Concluiu-se ainda que uma duração mais longa do tratamento culinário, fervura, contribuía para uma maior redução dos resíduos farmacêuticos podendo estes atingir uma redução de 80% no músculo. Porém na casca a redução chega apenas aos 20%. No entanto, o músculo do camarão após o tratamento prolongado tornou-se rijo e não comestível ³⁸.

No estudo referente ao OA registou-se uma redução generalizada de resíduos de OA em todas as amostras sujeitas a tratamentos culinários em relação às amostras não sujeitas a tratamentos culinários correspondentes. As concentrações de OA no músculo e na casca foram reduzidas entre 20 e 30% em todos os métodos de cozedura. Concluiu-se ainda que uma duração mais longa do tratamento culinário, fervura, contribuía para uma maior redução dos resíduos farmacêuticos podendo estes atingir uma redução de 49% de resíduos de OA quando o camarão estava sujeito ao tratamento culinário referido durante 12 minutos. Porém com um tempo de cozedura mais longo o camarão tornava-se rijo e não comestível ³⁹.

Apesar dos tratamentos culinários nestes dois estudos proporcionarem uma redução considerável dos resíduos farmacêuticos do alimento estas investigações mostram que tratamentos culinários comuns são incapazes de eliminar na totalidade estas substâncias. Estes resultados mostram também que os resíduos de OA eram relativamente termoestáveis nos

tecidos do camarão e que os quelatos de Ca-tetraciclina eram termoestáveis na casca do camarão ^{38, 39}.

Parte experimental

3.1 Amostragem

Os mexilhões *Mytilus spp.* (miolo de mexilhão) usados nos ensaios de cocção foram adquiridos comercialmente. Estes mexilhões oriundos do Chile foram produzidos em aquacultura. Adquiriram-se 5 embalagens destes mexilhões com 300g cada, sendo que cada embalagem pertencia a lotes distintos (A, B, C, D e E).

De modo a obter as 41 amostras de mexilhão necessárias: pesou-se, com a ajuda de uma balança analítica, mexilhões inteiros (1 ou 2) de modo a atingir o peso pretendido, $2.0 \pm 0,05$ g. Os mexilhões ou conjunto de mexilhões com o peso desejado foram colocados em tubos Falcon devidamente identificados com as seguintes informações: n° de mostra, lote e peso como é mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Número da amostra, lote e peso para as 41 amostras de mexilhão utilizadas nos tratamentos de cocção.

Nº amostra	Lote	Peso (g)
1	A	2,05
2	A	1,95
3	A	2,05
4	A	2,05
5	A	1,97
6	A	1,96
7	A	2,05
8	A	2,02
9	B	2,05
10	B	2,06
11	B	2,00
12	B	2,04
13	B	2,02
14	B	2,04
15	B	1,95
16	B	2,04
17	C	2,05
18	C	1,96
19	C	2,00
20	C	2,04
21	C	1,99
22	C	2,00
23	C	2,01
24	C	1,96
25	C	2,00
26	C	2,00
27	C	2,02
28	C	1,97
29	C	2,00
30	C	2,01
31	C	1,96
32	C	2,00
33	C	2,00
34	C	2,02
35	C	1,97
36	C	1,98
37	C	2,02
38	D	1,95
39	E	2,02
40	E	2,03
41	E	2,06

3.2. Materiais e Métodos

De seguida enumeram-se os materiais, equipamentos e métodos que foram usados na determinação de antibióticos em bivalves sujeitos a diferentes tipos de cocção.

3.2.1 Reagentes e Soluções

- Acetonitrilo (Honeywell- Riedel-De Haën, Seelze, Alemanha)
- Ácido fórmico a 98% (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- EDTA a 0,1M (Honeywell- Riedel-De Haën, Seelze, Alemanha)
- n-hexano (Carlo Erba Reagenti, Milão, Itália)
- Soluções Padrão: mistura de antibióticos betalactâmicos em água e mistura dos restantes antibióticos em acetonitrilo (Tabela 5).
- Padrões internos: sulfameter
- Marinada: preparada com a mistura dos seguintes ingredientes: 250ml de vinho branco, 45ml de sumo de limão, 2 folhas de louro e 11,01g de alho.

Tabela 5. Antibióticos injetados nos bivalves agrupados por família.

Família	Antibiótico	
	Betalactâmico	Não betalactâmico
Penicilinas	Benzilpenicillina	-
Tetraciclina	-	Clorotetraciclina Doxiciclina Epi-Clorotetraciclina Epi-Tetraciclina Oxitetraciclina Tetraciclina
Quinolonas	-	Cinoxacina Ciprofloxacina Danofloxacina Enoxacina Enrofloxacina Flumequina Marbofloxacina Ácido Nalidíxico Norfloxacina Ofloxacina Ácido Oxolínico
Sulfonamidas		Sulfacloropiridazina Sulfadiazina Sulfadimetoxina Sulfadimidina Sulfadoxina Sulfametizol Sulfametoxazol Sulfapiridina Sulfaquinoxalina Sulfatiazol Sulfisomidina Sulfisoxazol
Macrólidos	-	Tilosina A Tilmicosina Trimetoprim

3.2.2 Material e Equipamentos

- Balança Analítica Radwag modelo AS 220.RI PLUS (Radom, Polónia)
- Centrifugadora Sigma modelo 3-16K (St. Louis, E.U.A)
- Coluna cromatográfica Waters modelo Acquity UPLC HSS T3 1.8 μm , 2,1x100mm (Dublin, Irlanda)
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (UHPLC) Nexera X2 Shimadzu modelo DGU-20A5R (Quioto, Japão)
- Espectrómetro de massa Sciex modelo Triple TOF 5600+ (Framingham, E.U.A)
- Agitador (Agitelec, J. Toulemonde & CIE, Paris, França)
- Concentrador de Azoto (Stuart modelo SBH200D/3, Dublin, Irlanda)
- Ultrassons (Sonorex, Berlim, Alemanha)
- Vortex (VELP Scientifica, Província de Monza e Brianza, Itália).

3.2.3. Desenho experimental, método de administração dos antibióticos em bivalves e procedimentos de cocção

3.2.3.I. Desenho experimental

Na Tabela 6 apresenta-se o desenho experimental realizado. Para cada processo de cocção, grelhar, cozinhar em marinada e cozinhar a vapor (Figura 3, 4 e 5, respetivamente), procedeu-se do seguinte modo: Primeiramente, injetou-se 50 µl da solução de antibióticos betalactâmicos e 50 µl da solução dos restantes fortificando ao nível do limite máximo de resíduos (LMR), procedendo-se de forma idêntica para a fortificação ao nível de 2LMR (100 µl, respetivamente). Os Limites Máximos de Resíduos representam a quantidade máxima de determinada substância que um alimento pode possuir, de modo a não colocar em causa a saúde de pessoas e animais. Estes valores podem servir de referência para medidas de deteção de irregularidades e para legislação. Os valores de LMR e 2LMR para antibióticos podem ser consultados na Tabela 7 ⁴⁰.

Foram também selecionadas 6 amostras de mexilhões que não foram fortificadas, sendo 3 cozinhadas (brancos cozinhados) e 3 crus (brancos crus).

Tabela 6. Desenho experimental.

Processo Térmico	Grelhar	Marinada	Vapor
Concentrações de Antibióticos	LMR	LMR	LMR
	2xLMR	2xLMR	2xLMR
	Branco cozinhado	Branco cozinhado	Branco cozinhado
	Branco em cru	Branco em cru	Branco em cru
Replicados	3	3	3
Total de amostras		36	

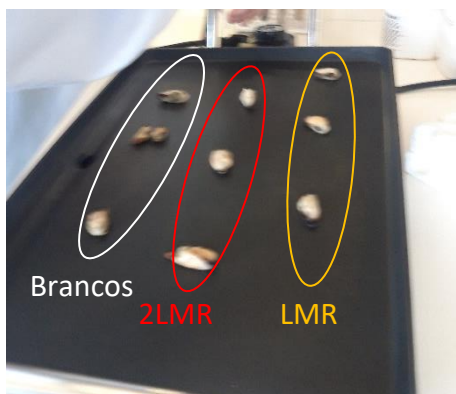


Figura 3. Disposição das amostras de mexilhão na chapa. Cocção: Grelhar na chapa.



Figura 4. Cocção no “Tacho” ou marinada. As nove amostras foram divididas por 2 placas de aquecimento e fervidas durante 2 minutos.

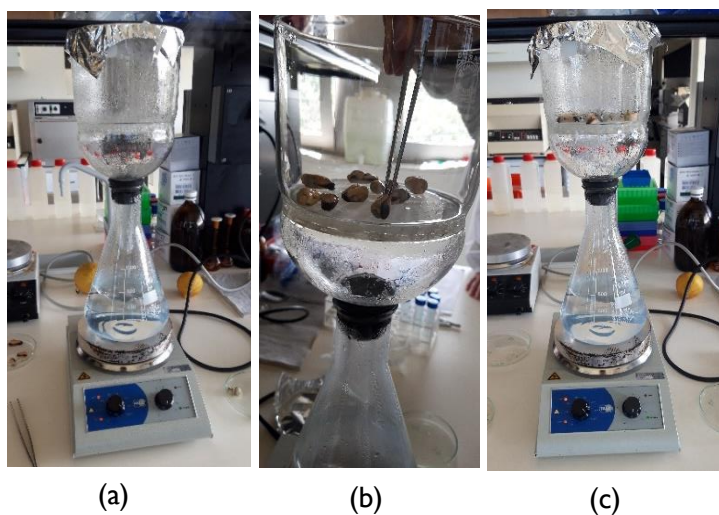


Figura 5. Balão volumétrico com uma placa filtrante numa placa de aquecimento (a); mexilhões colocados em cima da placa filtrante (b) de modo a dar início ao processo de cocção Cozer a Vapor (c).

Após a cocção as amostras foram novamente pesadas. Os resultados das pesagens apresentam-se no Anexo I.

Tabela 7. Valores do LMR e 2LMR para cada antibiótico.

Antibiótico	LMR	2LMR	Antibiótico	LMR	2LMR
Benzilpenicilina	50	100	Sulfadiazina	100	200
Clorotetraciclina	100	200	Sulfadimetoxina	100	200
Cinoxocina	100	200	Sulfadimidina	100	200
Ciprofloxacina	100	200	Sulfadoxina	100	200
Danofloxacina	100	200	Sulfametizol	100	200
Doxiciclina	100	200	Sulfametoxazol	100	200
Enoxacina	100	200	Sulfapiridina	100	200
Enrofloxacina	100	200	Sulfaquinoxalina	100	200
Epi-Clorotetraciclina	100	200	Sulfatiazol	100	200
Epi-Tetraciclina	100	200	Sulfisomidina	100	200
Flumequina	200	400	Sulfisoxazol	100	200
Mabofloxacina	150	300	Tetraciclina	100	200
Ácido Nalidíxico	100	200	Tilmicosina	50	100
Norfloxacina	100	200	Trimetoprim	50	100
Ofloxacina	100	200	Tilosina A	100	200
Ácido Oxolínico	300	600	Sulfadiazina	100	200
Oxitetraciclina	100	200	Sulfacloropiridazina	100	200

3.2.3.2. Método de fortificação dos antibióticos nos bivalves

Este passo foi comum a todos os ensaios de cocção e procedeu-se do seguinte modo:

As amostras, sujeitas a fortificação ao nível do LMR e de 2LMR, foram injetadas respetivamente com 50 e 100 µl de solução de antibióticos betalactâmicos e com 50 e 100 µl da solução que continha os restantes antibióticos. A administração das soluções foi executada com o auxílio de uma micropipeta, inserindo a mesma na zona do sifão inalante e exalante (Figura 6) ⁴¹.

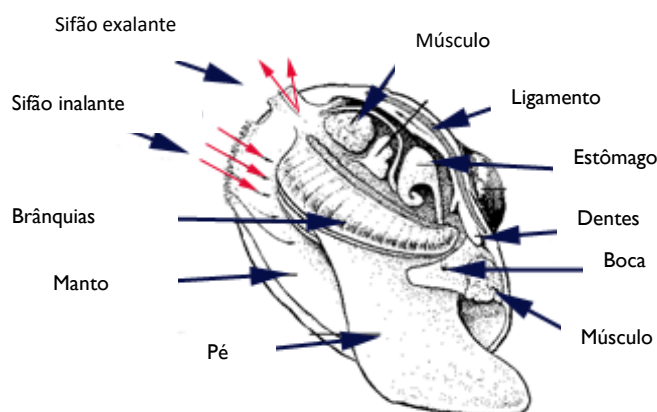


Figura 6. Anatomia de um mexilhão (Figura adaptada da referência 41).

No caso de a amostra ser composta por 2 mexilhões em vez de um tentou-se distribuir de forma idêntica a quantidade de fármacos injetada por mexilhão.

Todos os ensaios experimentais foram executados em triplicado como descrito na tabela anterior.

3.2.4. Metodologia Analítica

3.2.4.1. Extração

Após a homogeneização das amostras, adicionou-se, a cada uma 20 µl de solução de padrão internos (sulfameter).

Posteriormente, as amostras foram extraídas no ultrassons durante 5 minutos e em seguida agitadas no reax por mais 15 minutos.

Após centrifugação a 2879 g (força centrífuga), por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de centrifugação, ao qual se adicionou 2ml de n-hexano.

Os extratos foram novamente agitados no vortex (30 segundos) e centrifugados (2879 g durante 10 minutos a 4°C).

O sobrenadante, correspondente à fase de n-hexano, foi descartado e os extratos foram evaporados à secura sob corrente suave de azoto a 40°C, até um volume de cerca de 0,5 mL.

3.2.4.2. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa em Tandem

Esta parte do protocolo foi realizada pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) no Polo de Vairão e compreendeu os seguintes passos:

- 1- Foi adicionado ao extrato 200 µl de fase móvel A (ácido fórmico 0,1%).
- 2-As amostras foram agitadas uma última vez no vortex por 15 segundos.
- 3-Filtrou-se com filtros de 0,45 µm e transferiu-se para vials de HPLC.

Características específicas do método usado:

UHPLC Nexera X2 Shimadzu acoplado com Triple TOF™ 5600+ AB Sciex

Ionização por “electrospray” (ESI) no modo positivo

Gama de massas ToF: 100 – 920 Da

UHPLC:

- Coluna cromatográfica Waters modelo Acquity UPLC HSS T3 1.8 µm, 2,1x100mm
- Temperatura da coluna: 40°C
- Taxa de fluxo: 0,5 mL/minuto
- Volume de injeção: 10 µL
- Fase móvel A: 0,1% de ácido fórmico
- Fase móvel B: Acetonitrilo
- Gradiente (Tabela 8):

Tabela 8. Gradiente

Tempo (min)	%A	%B
0	97	3
2	97	3
5	40	60
9	0	100
10	97	3
11	97	3

Cálculo da percentagem da concentração inicial

Os dados apresentados nos gráficos dos resultados foram obtidos através da seguinte fórmula matemática, que significa a percentagem da concentração do respetivo fármaco em relação à sua concentração inicial pré cocção:

$$\% \text{ da concentração inicial} = \frac{(\text{Peso inicial} / \text{Peso final}) \times \text{concentração inicial}}{\text{LMR ou 2LMR}}$$

- Peso inicial- 2g
- Peso final- Foi medido após cocção (Anexo 1)
- Concentração inicial- Obtida através do método de HPLC-MS/MS

3.2.5. Análise e tratamento estatístico

Por forma a tratar os dados utilizou-se o programa informático *Graphpad Prism 9*. O tipo de gráfico que usei foi o diagrama de extremos e quartis (*Box-plot* ou *Box-and-whisker plot*) que é um dos recursos mais usados para representar graficamente uma dada variável. Com o uso deste tipo de gráfico pretendeu-se uma representação gráfica simples das variáveis em questão. O diagrama de extremos e quartis é particularmente eficaz para a comparação de dois ou mais conjuntos de dados correspondentes às categorias de uma variável ⁴². Os parâmetros representados neste tipo de gráfico de gráfico são o primeiro quartil (25% dos dados apresentam valores inferiores a este), o segundo quartil ou mediana (50% dos dados apresentam valores superiores a este), o terceiro quartil (25% dos dados apresentam valores

superiores a este), limite superior (valores máximos, sem os *outliers*) e limite inferior (valores mínimos, sem os *outliers*)⁴³.

Se for utilizado em situações adequadas permite a identificação de *outliers* caso eles existam, permite avaliar a simetria dos dados e a sua dispersão e permite ainda a comparação de grupos de amostras⁴².

Para a análise estatística dos diferentes dados nas várias figuras usou-se:

-Anova de uma via para os dados das Figuras 7 e 9. A anova de uma via permite aferir se existem diferenças estatísticas significativas entre as médias de 3 ou mais grupos independentes⁴⁴.

-Teste t para amostras independentes para os dados da Figura 8. Este teste possibilita a comparação das médias de dois grupos de amostras quando cada amostra é independente de todas as amostras do outro grupo⁴⁵.

-Anova de duas vias para os dados das Figuras 10, 11, 12, 13 e Anexos 3, 4, 5 e 6. A anova de duas vias possibilita avaliar o efeito de duas variáveis independentes numa variável⁴⁶.

Nas figuras presentes nos resultados e discussão usou-se a notação presente na tabela 9 relativamente à significância estatística das comparações entre os diferentes grupos de dados.

Tabela 9. Notação usada no programa Graphpad Prism 9 relativamente à significância estatística das comparações entre os diferentes grupos de dados.

Valor de P	Designação	Notação Gráfica
< 0.0001	Extremamente significativo	****
0.0001 a 0.001	Extremamente significativo	***
0.001 a 0.01	Muito significativo	**
0.01 a 0.05	Significativo	*
≥ 0.05	Não significativo	NS

Resultados e Discussão

4.1. Comparação dos diferentes processos de cocção

A principal questão a que o presente estudo tenta responder é qual os efeitos dos vários tipos de cocção na concentração de antibióticos em bivalves. Segundo os resultados é possível constatar que de modo geral todos os procedimentos culinários provocam uma remoção de parte da concentração de antibióticos (Figura 7).

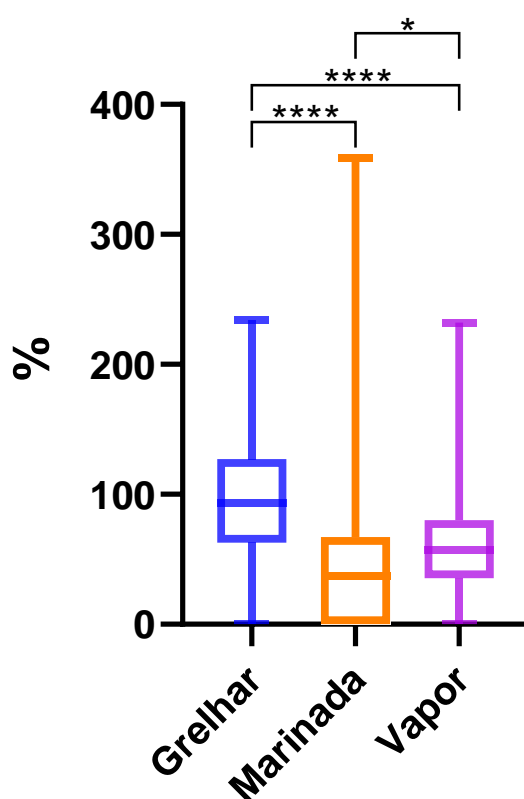


Figura 7- Percentagem da concentração inicial dos antibióticos nas amostras em relação aos três tipos de cocção em estudo.

Este resultado era expectável visto que, segundo alguma bibliografia publicada, parece que a temperaturas elevadas está associada a remoção de parte da concentração de antibióticos e que essa remoção tende a aumentar também com o incremento da temperatura^{37, 38, 45 - 49}. A teoria cinética dos gases diz que as colisões moleculares aumentam em função da temperatura, por outras palavras, um aumento da temperatura provoca um aumento da

reatividade ⁵⁰. Este facto pode ajudar a explicar a remoção de uma percentagem de antibióticos.

É possível denotar também que os diferentes métodos de cocção têm impactos diferentes na concentração dos antibióticos. Isto é provado pela existência de diferenças estatisticamente significativas entre os vários métodos de cocção. Como se pode ver pelo gráfico existem diferenças estatisticamente extremamente significativas entre o método grelhar e os outros dois métodos e uma diferença significativa entre a marinada e o vapor. Contudo, o método mais eficaz na remoção será a marinada, depois o vapor e por fim grelhar (Figura 7).

Era expectável que grelhar seria o método que menos iria remover antibióticos dado que os mexilhões estavam em contacto apenas com uma placa de aquecimento e que ao aumentar a sua temperatura iria provocar perda de água nos mexilhões. Este foi o procedimento que provocou em média maior perda de água nas amostras. De facto, como se mostra no Anexo I, em média, foi este o procedimento que provocou maior perda de peso (0,76g em média). Assim sendo, apesar da temperatura elevada proporcionada pela grelha ter ajudado a remover antibióticos o facto de os mexilhões terem reduzido muito o seu teor em água e por conseguinte o seu volume, proporcionou também que os antibióticos ficassem mais concentrados. Este fenómeno justifica o facto de este ser o método que apresenta, no geral, menor % de remoção.

Cozinhar a vapor é mais eficaz a remover antibióticos do que grelhar, mas menos eficaz que a marinada. Este resultado vai ao encontro do que era esperado. O vapor é gerado por água a ferver, que evapora e transporta o calor para os mexilhões. O método de cozinhar a vapor já foi estudado no efeito na concentração de antibióticos e mostrou que promovia a sua remoção. Nesse artigo detetou-se fármacos na água de cozedura o que mostra que ocorreu extração dos mesmos devido ao efeito do vapor provocado pela fervura da água. Uma explicação dada pelos autores é a de que a água, quando sujeita a aumento de temperatura sob pressão até ao ponto subcrítico (100-374°C), exhibe características idênticas a solventes orgânicos. Sendo que a água já foi usada como solvente de extração para vários contaminantes ambientais como Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) ²⁰. Isto mostra que a água quando aquecida da maneira mencionada poderá promover também a remoção de antibióticos, sendo expectável a deteção de resíduos farmacêuticos menos polares na água de cozimento ²⁰. Também se verificou perda de água neste método, mas inferior ao método de grelhar (em média 0,58g perdidas por amostra) o que mostra que no procedimento a vapor o volume sofre menor redução no que a grelhar, logo os antibióticos não vão ser tão concentrados. Outro aspeto deste procedimento é que não está diretamente em contacto

com a água e com a fonte de aquecimento. É sabido que cozinhar a vapor ajuda a preservar nutrientes que são sensíveis ao calor e à água ⁵¹. Tal facto pode ajudar a manter uma maior integridade da composição das amostras. Sendo talvez uma das razões que explique a sua menor eficácia face à marinada.

Por fim era teoricamente expectável que a marinada fosse o processo mais eficaz na remoção de antibióticos, uma vez que os mexilhões se encontravam em contacto direto com o meio aquoso e com a fonte de aquecimento, o que facilita a sua biodegradação. Por outro lado, o facto de a marinada acontecer em meio ácido, dado que fazem parte da sua composição sumo de limão e vinho branco também eles com pH ácido, também favorece a remoção destes compostos, tal como demonstrado por alguns estudos ^{52; 53}, sendo que em meio aquoso isso acontece porque essas condições parecem promover um aumento da taxa de hidrólise provocando a degradação e remoção dos antibióticos ⁴⁸. Também é neste procedimento culinário que se verifica a menor perda de peso, apenas 0,34g em média por amostra, o que é menos de metade face ao grelhar. Outro motivo para este método ser mais eficiente na remoção pode ser o facto de que os mexilhões estão em contacto direto com o líquido (marinada), podendo haver transferência de fármacos para a marinada, quer antes quer durante a cocção. Isto mostra que a marinada é de todos os métodos o que proporciona menor perda de água e por isso aquele em que o aumento da concentração de antibióticos proporcionada pela perda de volume é menor. Estes aspetos parecem justificar a maior eficácia da marinada quando comparada com os outros tipos de cocção.

4.2. Comparação entre níveis de fortificação

Outro dos objetivos desta dissertação era perceber se o tipo de fortificação, LMR ou 2LMR, influenciava ou não o efeito da cocção na concentração de antibióticos. De acordo com os resultados não existem diferenças estatisticamente significativas no efeito que as fortificações tiveram sob o efeito da cocção nas concentrações de antibióticos nas amostras (Figura 8), ou seja, não existe diferença significativa entre utilizar a fortificação LMR ou 2LMR no que toca à percentagem remanescente dos antibióticos face à cocção dos mexilhões.

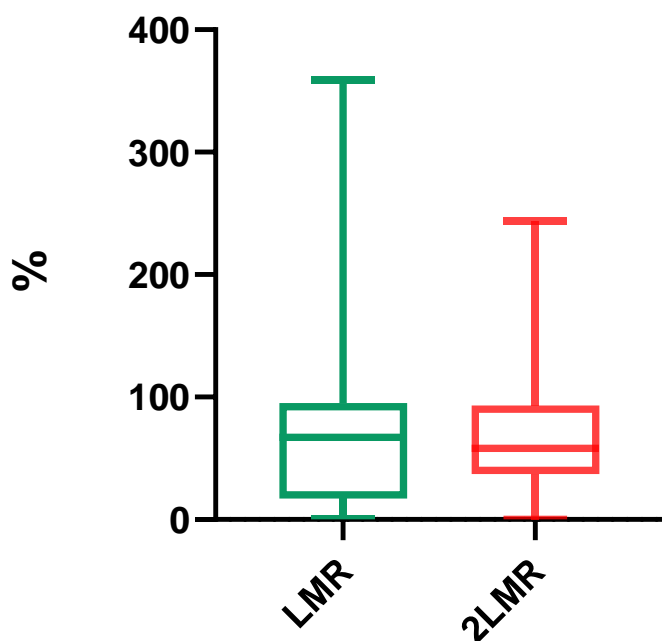


Figura 8. Percentagem da concentração inicial dos antibióticos nas amostras em relação ao tipo de fortificação a que estiveram sujeitas (LMR ou 2LMR)

Estes resultados coincidem com outros publicados na literatura científica. Sendo o fator comum aos três métodos de cocção a temperatura elevada é importante perceber então a estabilidade de antibióticos a temperaturas elevadas mesmo que em concentrações diferentes. Noutro estudo, a redução de antibióticos após aumento da temperatura não foi significativamente diferente em 3 concentrações distintas. Assim sendo os autores concluíram que os efeitos do aquecimento sobre os antibióticos foram semelhantes nessas três concentrações ⁴⁹. Este artigo fortalece a tese de que o efeito da cocção, nomeadamente o calor, não depende da concentração dos antibióticos.

4.3 Comparação entre famílias de antibióticos

De acordo com os resultados obtidos pode-se constatar também que diferentes famílias de antibióticos podem comportar-se de maneira diferente no que toca ao efeito que a confeção tem na concentração de fármacos. Isto era expectável dado que as diferentes classes de antibióticos possuem características físico-químicas distintas e por isso têm comportamentos diferentes no meio aquático ¹² e outros.

Todas as famílias mostraram na generalidade das amostras uma redução da concentração de antibióticos o que vai ao encontro do que já foi dito. São notórias, como se evidencia na Figura 9 as diferenças extremamente significativas entre as penicilinas e 3 outras

famílias: sulfonamidas, tetraciclina e quinolonas. Para além disso as penicilinas e os macrólidos também possuem diferenças muito significativas.

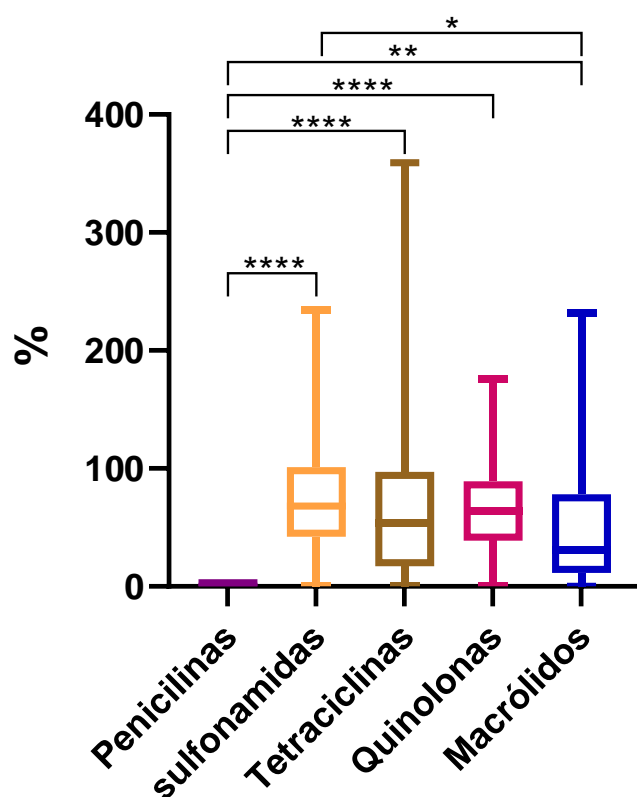


Figura 9. Percentagem da concentração inicial dos antibióticos nas amostras em relação às famílias de antibióticos em estudo.

Através da Figura 9 é então possível visualizar que as penicilinas são a família de antibióticos mais suscetível à remoção face à cocção. Este resultado era expectável visto que, as penicilinas possuem na sua estrutura um anel betalactâmico que é suscetível a degradação. Esta é uma das razões apontadas para que as ETARs consigam degradar quase na totalidade esta classe de antibióticos, sendo bastante raro encontra-las em águas de superfície ¹². Os antibióticos betalactâmicos, como sejam as penicilinas demonstraram ter uma resistência ao aumento da temperatura bastante variável resultando na degradação de antibióticos entre os 20% e os 60% ⁴⁹. Estes valores parecem muito inferiores face aos 100% de degradação observados nos métodos de cocção. No entanto, isso pode ser explicado pelo facto de que na cocção a temperatura ser apenas um dos fatores que contribuem para a degradação de antibióticos, mas não o único. No mesmo estudo as tetraciclina demonstraram ter uma resistência ao aumento da temperatura bastante variável também. Oscilando de menos de 20% para mais de 50%. Esta grande variabilidade dentro destas duas famílias de antibióticos levou aos autores a crer que não é correto prever a estabilidade térmica com base apenas na classe

de antibióticos ⁴⁹. A penicilina G que é uma penicilina e a única representante desta família neste trabalho é sensível ao ácido gástrico devido ao seu baixo pH ⁵⁴. Logo podemos afirmar que o facto da penicilina G ser sensível a baixos pH como o presente na marinada fortalece os resultados de que esta é a família mais sensível aos métodos de cocção.

Entre os macrólidos e as sulfonamidas existem diferenças significativas. Sendo perceptível que os macrólidos são mais facilmente removíveis que as sulfonamidas (Figura 9). O facto de as sulfonamidas serem difíceis de remover face à cocção era esperado dado que segundo um artigo já mencionado as sulfonamidas podem ser consideradas termo tolerantes sendo que se observou nesse estudo a uma degradação muito pequena, cerca de 4%, devido a temperaturas elevadas (100-121°C) ⁴⁹. Já os macrólidos parecem ter uma resistência menor à temperatura em comparação às sulfonamidas. Por exemplo a tilosina, pertencente à família dos macrólidos, em solução aquosa ou no leite é removida no máximo cerca de 11% a 62°C por 30 minutos, 13,31% a 78°C por 30 segundos e 6,47% a 128°C por 4 segundos ⁵⁵. Longe dos 4% de degradação máxima nas sulfonamidas já mencionado. Este facto ajuda a explicar o porquê de as sulfonamidas serem mais resistentes à degradação que os macrólidos quando sujeitos a procedimentos de cocção.

A única representante da família das penicilinas é a penicilina G também conhecida como benzilpenicilina. Os resultados mostram que os três métodos de cocção eliminaram em 100% a concentração desse antibiótico nas amostras (Anexo 2). Como já se pode constatar pelo Anexo 2 as penicilinas são a família mais suscetível aos métodos de cocção. A penicilina G é sensível à temperatura podendo ocorrer degradação do antibiótico até 60% quando sujeito a temperaturas elevadas ⁴⁹. É sensível a pH ácido, como o encontrado na marinada, uma vez que o sistema de anel bicíclico, que consiste num anel de quatro membros e outro de cinco, faz com que a penicilina G tenha um ângulo de torção grande. O meio ácido tem um efeito catalisador no rompimento e conseqüente abertura do anel de quatro membros, ficando este com menos tensão ⁵⁴. Assim podemos concluir que é principalmente por possuírem na sua estrutura um anel betalactâmico que as penicilinas são mais suscetíveis à degradação, sendo por essa razão que raramente são encontradas em águas superficiais ¹². Assim sendo é possível afirmar que estes resultados estão em conformidade com o que era esperado. No entanto, para a obtenção de uma maior representatividade da família das penicilinas no futuro deverá-se estudar adicionalmente outros antibióticos desta família.

Para a família dos macrólidos os resultados indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre as fortificações para o método de cocção grelhar (Figura 10).

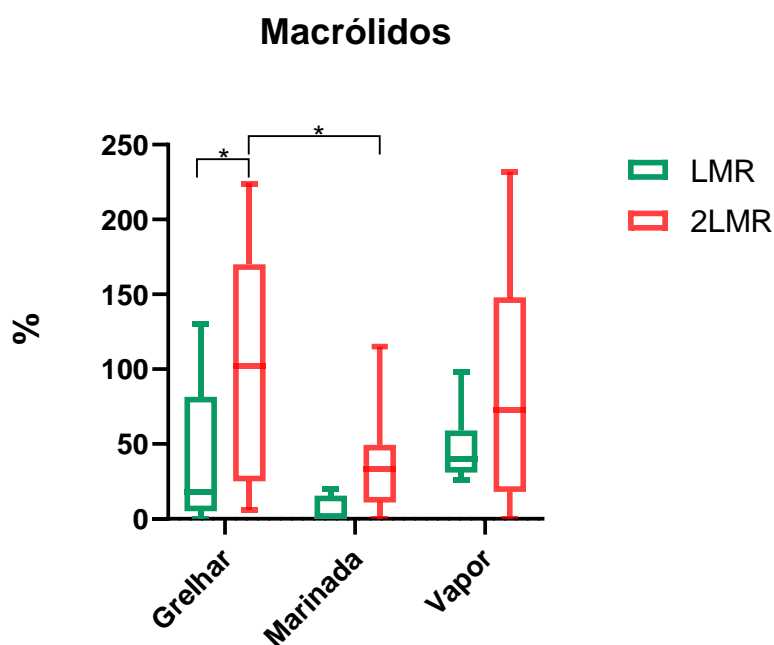


Figura 10. Percentagem da concentração inicial de macrólidos após os três métodos de cocção.

Tal não era expectável face à bibliografia já mencionada e os resultados obtidos representados na Figura 8. É possível ver que existe uma maior remoção de antibiótico nas amostras sujeitas a fortificação LMR. Um resultado semelhante foi encontrado para outros dois antibióticos da família dos macrólidos: claritromicina e roxitromicina. Aumentando a concentração destes medicamentos a degradação dos mesmos através de foto oxidação diminuiu. Os autores explicaram que a concentrações mais elevadas destes antibióticos a solução seria menos transparente à luz UV, sendo que parte dessa luz seria absorvida pelas moléculas dos antibióticos resultando numa diminuição de luz a atingir o catalisador reduzindo dessa forma a formação de radicais OH⁵⁶. Este foi o resultado mais próximo que encontrei na literatura científica face ao resultado obtido nesta dissertação. Porém a explicação para tal resultado não se adequa ao estudo desta dissertação uma vez que estamos a falar de uma matriz sólida opaca (mexilhão) e não líquida e transparente.

Existem diferenças estatisticamente significativas entre a cocção grelhar e marinada para a fortificação 2LMR (Figura 10). Sendo a marinada comparativamente com grelhar o procedimento mais bem-sucedido na remoção de antibióticos nesta família. Tal era expectável uma vez que a cocção marinada proporciona um meio ácido e com temperaturas elevadas propicio à degradação da maioria dos macrólidos^{55; 57}, ao passo que o método grelhar

proporciona apenas calor. Adicionalmente também é o método grelhar que resulta numa maior perda de água e por sua vez de volume permitindo uma maior concentração de antibióticos.

Na família das tetraciclina, segundo os resultados, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em relação às fortificações (Figura 11). Algo que era esperado tendo em conta a Figura 8 e a bibliografia mencionada que afirmava que a concentração de antibióticos não influencia significativamente o efeito de temperaturas elevadas, característica comum aos 3 métodos de cocção em estudo, na concentração de antibióticos ⁴⁹.

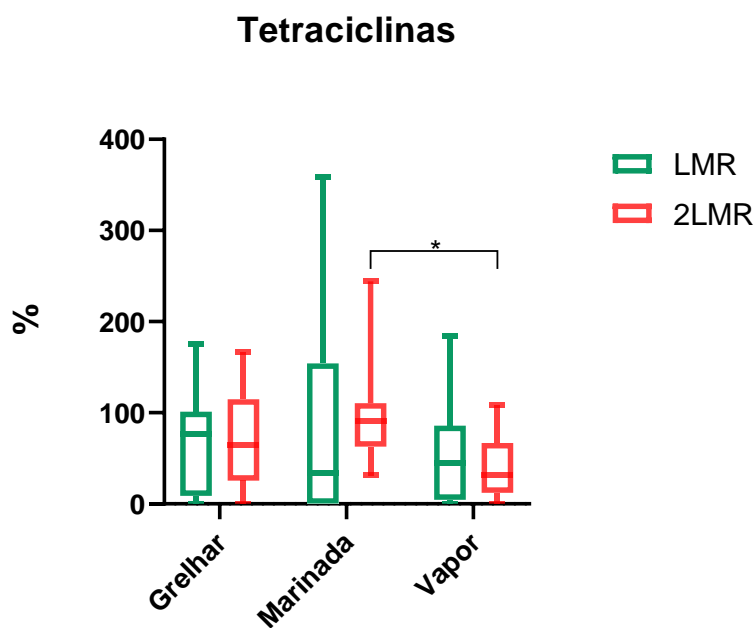


Figura 11. Percentagem da concentração inicial de tetraciclina após os três métodos de cocção.

Na fortificação 2LMR existem diferenças estatisticamente significativas entre a cocção marinada e vapor (Figura 11). Ao contrário do panorama geral mostrado na Figura 7 e da bibliografia que suportava esse gráfico, a marinada parece ser menos eficaz a remover antibióticos da família das tetraciclina que o vapor. Um dos fatores que faz com que a marinada seja no geral mais eficaz que o vapor é o facto de que a maioria dos antibióticos ser sensível a pH ácido. No entanto as tetraciclina são relativamente estáveis em meios ácidos, mas não em básicos ⁵⁸. Não sendo por isso o meio ácido da marinada um fator relevante na remoção de tetraciclina. A extração e/ou degradação dos antibióticos foi então mais eficaz devido ao efeito do vapor provocado pela fervura da água. Já foi dito que a água exhibe características idênticas a solventes orgânicos quando aquecida até certo ponto ²⁰ sendo esse fenómeno responsável por uma maior remoção das tetraciclina.

Na família das quinolonas é possível observar uma diferença estatisticamente significativa entre as fortificações LMR e 2LMR para a cocção marinada (Figura 12).

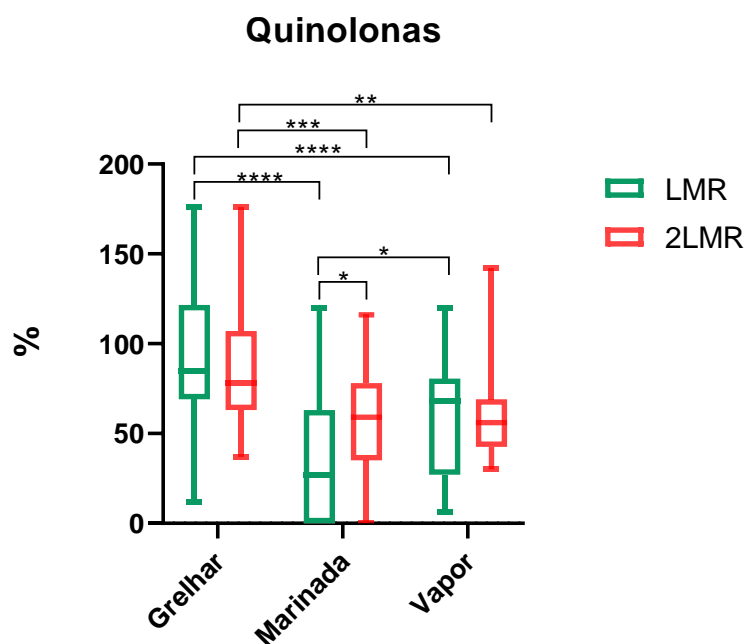


Figura 12. Percentagem da concentração inicial de quinolonas após os três métodos de cocção.

Podendo-se afirmar que neste caso a fortificação ao LMR favorece mais a degradação que a fortificação a 2LMR. Este resultado vai um pouco contra o obtido na Figura 8 e a bibliografia que a suporta. No entanto na literatura científica é possível encontrar um estudo que pode explicar este fenómeno nas quinolonas. Os resultados desse artigo mostram que condições de pH ácido aliadas a concentrações iniciais baixas de ciprofloxacina (quinolona usada no estudo) promovem a sua remoção através de radiação γ ⁵⁹.

Nas fortificações LMR existem diferenças estatisticamente extremamente significativas entre grelhar e marinada e entre grelhar e vapor (Figura 12). Sendo a marinada e o vapor mais eficientes na remoção dos fármacos desta família que o método grelhar. Isto era expectável tendo em conta que temperaturas elevadas⁶⁰ e condições de pH ácido⁶¹, condições proporcionadas pela marinada, parecem ajudar na degradação das quinolonas. Já no caso do vapor será as propriedades que a água adquire quando aquecida até determinada temperatura²⁰ que permite uma degradação maior que no grelhar, que apenas fornece altas temperaturas. Ainda nestas fortificações existem diferenças estatisticamente significativas entre a marinada e vapor (Figura 12). Sendo que segundo os resultados a marinada promove maior remoção de quinolonas que o vapor. Tal também era esperado, uma vez que por exemplo o antibiótico ciprofloxacina, que é uma quinolona é degradado mais facilmente em pH ácido⁶¹ e pelo facto

de na marinada ocorrer menos perda de água e por sua vez de volume das amostras que no vapor.

Nas fortificações 2LMR existem diferenças estatisticamente extremamente significativas entre grelhar e marinada e muito significativas entre grelhar e vapor (Figura 12). Estes resultados já eram esperados e são suportados pelo que já foi dito para as fortificações LMR, sendo que mostram mais uma vez a maior eficácia dos procedimentos culinários vapor e marinada.

Quanto à família das sulfonamidas, os resultados mostram que existem diferenças estatisticamente muito significativas entre as fortificações LMR e 2LMR para a cocção a vapor (Figura 13).

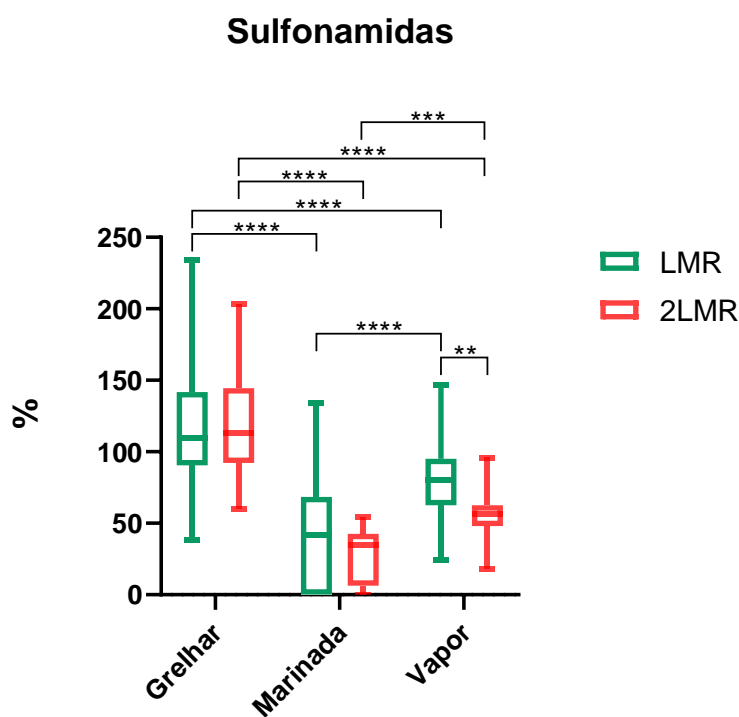


Figura 13. Percentagem da concentração inicial das sulfonamidas após os três métodos de cocção.

Estes resultados não eram esperados à primeira vista tendo em conta os resultados da Figura 8 e da bibliografia que a suporta. No entanto, foi possível encontrar dados na literatura científica que indicam que a degradação de sulfonamidas dá-se de maneira mais célere em águas com maior concentração destes antibióticos⁶² que é exatamente o que se observou nos resultados desta dissertação.

Tanto nas amostras que sofreram fortificação LMR como nas 2LMR pode-se observar diferenças estatisticamente extremamente significativas entre os métodos de cocção grelhar e os outros dois métodos e entre a marinada e o vapor (Figura 13). Sendo que pela Figura 13

é possível observar que nesta família a cocção grelhar na maioria das amostras provocou um aumento da concentração de antibióticos. Isto era previsível uma vez que este tipo de cocção apenas fornece calor às amostras. Como já foi referido as sulfonamidas podem ser consideradas termo tolerantes pelo que ocorre pouca degradação pelo efeito das altas temperaturas ⁴⁹. Por outro lado, o calor fornecido vai provocar perda de água nas amostras e consequentemente de volume. A perda de volume considerável adicionada à quase inexistente degradação de sulfonamidas faz com que haja um aumento de concentração deste fármaco nas amostras, que é o que se vê em cerca de 75% dos resultados nas duas fortificações. Os outros dois procedimentos provocaram na maioria das amostras uma redução da concentração de antibióticos, sendo que o mais eficiente nessa tarefa foi a marinada. Este resultado era esperado uma vez que o meio ácido, como se observa na marinada, promove degradação na generalidade dos antibióticos sulfonamidas ⁵³. Também é a marinada que promove uma menor redução de volume das amostras. Estas razões permitem explicar a eficiência da marinada na remoção de sulfonamidas.

A visualização e interpretação dos dados das famílias de antibióticos é importante pois dá-nos uma visão geral de como cada grupo interage com os métodos de cocção. Porém há que ter em atenção que dentro de cada família existe uma grande variabilidade de propriedades físico-químicas e, por isso, uma grande diversidade de respostas aos meios proporcionados pelos procedimentos culinários. Isto é facilmente detetado quando se analisa os dados de cada antibiótico individualmente e se compara com os dados agrupados por família. Existem alguns antibióticos com comportamentos bastante diferentes face à cocção quando comparados com o comportamento da família a que pertencem. Como exemplos, temos a tilosina A (Anexo 3) pertencente aos macrólidos, a doxiciclina (Anexo 4) pertencente às tetraciclina, a cinoxacina (Anexo 5) pertencente às quinolonas e a sulfaquinoxalina (Anexo 6) pertencente à família das sulfonamidas.

Conclusão e perspectivas futuras

Neste trabalho tentou-se perceber de que modo 3 tipos diferentes de confecção afetam concentrações de antibióticos em bivalves. Concluiu-se que no geral estes métodos de cocção promovem uma diminuição da concentração de fármacos nos bivalves. Sendo que é a marinada, na maioria dos casos, o método que proporciona maior remoção de antibióticos, seguida pela cocção a vapor e pelo grelhar. No entanto existe a possibilidade de que os antibióticos ao serem removidos do mexilhão através da cocção marinada possam migrar para o líquido da marinada que como se sabe também é ingerido. Se tal acontecer significa que estaremos na mesma a ingerir uma grande quantidade de antibióticos ou talvez até perto da totalidade que estava inicialmente no bivalve antes de ser cozinhado. Chegou-se também à conclusão de que na generalidade o tipo de fortificação, LMR ou 2LMR, não influencia o efeito da cocção na concentração de antibióticos. Porém agrupando os fármacos por família podemos constatar comportamentos distintos face à cocção devido às propriedades físico-químicas de cada família. A interpretação dos dados agrupados em famílias de antibióticos possibilita criar um cenário generalista de como cada classe de antibióticos reage aos diferentes tipos de cocção. Todavia há que ter em conta a grande variabilidade de propriedades físico-químicas dentro de cada família. Assim sendo, é expectável uma grande variedade de respostas, mesmo dentro de cada família, face a diferentes procedimentos culinários. Algo que se comprova analisando os antibióticos individualmente.

Em suma, é necessário agir para contrariar esta tendência de poluição do ambiente aquático com compostos farmacêuticos e consequentemente diminuir os efeitos tóxicos inerentes quer para os ecossistemas quer para o Homem. Aliás no decorrer deste trabalho a amostra 19, uma amostra que não foi sujeita a fortificação de antibióticos e que não sofreu tratamentos culinários e por isso não devia conter qualquer vestígio de antibióticos deu positivo para a doxiciclina (127,1 ug/kg). O que mostra que o risco de estarmos a consumir bivalves contaminados com antibióticos é real e acontece hoje em dia.

O primeiro passo para evitar a contaminação do ambiente e consequentemente evitar malefícios para o Homem e para o ecossistema será o de diminuir o uso de antibióticos apenas para casos necessários. Sendo que para isso é necessário educar a população para o uso correto de antibióticos e sensibilizar as pessoas para a problemática que envolve o uso excessivo destes fármacos. Por outro lado, é necessário diminuir o uso de antibióticos de uso humano em medicina veterinária. Desta forma iremos estar a contribuir para prevenir a

poluição do meio aquático e ainda a contribuir para uma desaceleração da criação de bactérias resistentes a antibióticos.

Sendo as águas residuais a grande fonte destas substâncias nos sistemas aquáticos é crucial também uma revisão e melhoria dos processos de tratamento das águas nas ETARs com a finalidade de pelo menos atenuar as concentrações dos referidos compostos na natureza ². Outra das medidas seria a revisão do ciclo de desenvolvimento do medicamento uma vez que este não contempla uma avaliação exaustiva da toxicidade ambiental inerente aos compostos farmacêuticos. Também não exige uma investigação para apurar que metabolitos se formam aquando da biotransformação no organismo ². Esta medida iria permitir conhecer de antemão os efeitos tóxicos potenciais destas substâncias no ambiente impedindo muitas de chegarem ao mercado evitando que provocassem tais efeitos.

Quanto aos bivalves, como bioindicadores das alterações do meio e alimento humano, deve-se continuar a fazer uma monitorização permanente das concentrações de antibióticos e ainda elaborar novos estudos, principalmente sobre os efeitos dos tratamentos culinários nestas substâncias, composto original e metabolitos correspondentes, para perceber qual o verdadeiro grau de risco para o Homem enquanto consumidor de modo a implementar medidas para mitigar esse mesmo risco.

Referências Bibliográficas

1. Decreto-Lei n.º 176 / 2006. (2006) 6–9.
2. NUNES, Bruno - **Fármacos no ambiente: implicações ecotoxicológicas**. Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos. I (2010) 9–20.
3. ALMEIDA, Â. *et al.* - **Fármacos No Ambiente Aquático: Quais Os Efeitos Nos Bivalves?**. Portugal. 2017).
4. MONTEIRO, Sara C.; BOXALL, Alistair B. A. - **Occurrence and Fate of Human Pharmaceuticals in the Environment**. York : Springer Science + Business Media, 2010. ISBN 9781441911568.
5. ALMEIDA, Ângela *et al.* - **Presence of the pharmaceutical drug carbamazepine in coastal systems : Effects on bivalves**. Aquatic Toxicology. 2014) 74–87.
6. ANTUNES, S. C. *et al.* - **Biochemical effects of acetaminophen in aquatic species: Edible clams *Venerupis decussata* and *Venerupis philippinarum***. Environmental Science and Pollution Research. 2013) 6658–6666.
7. JELIĆ, A. *et al.* - **Emerging and Priority Pollutants in Rivers: Bringing Science into River Management Plans**. New York : [s.n.]. ISBN 9783642257216.
8. LANDRY, Kelly A.; BOYER, Treavor H. - **Life cycle assessment and costing of urine source separation : Focus on nonsteroidal anti-inflammatory drug removal**. Water Research. 2016) 487–495.
9. SANTOS, Lucilaine Valéria De Souza *et al.* - **Study of fluoroquinolone biodegradability by using aerobic and anaerobic biomass**. Engenharia Sanitaria e Ambiental. I (2020) 69–77.
10. CARVALHO, Isabel T.; SANTOS, Lúcia - **Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario**. Environment International. 2016) 736–757.
11. KOVALAKOVA, Pavla *et al.* - **Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review**. Chemosphere. 2020) 126351.
12. HARROWER, Jamie *et al.* - **Chemical Fate and Partitioning Behavior of Antibiotics in the Aquatic Environment—A Review**. Environmental Toxicology and Chemistry. 12 (2021) 3275–3298.
13. HEALTH, National Institute Of - **Pubchem**, atual. 2004. [Consult. 8 ago. 2022]. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
14. **Drugbank** - atual. 2006. [Consult. 1 ago. 2022]. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs>
15. ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY - **Chemspider search and share chemistry**,

atual. 2022. [Consult. 2 ago. 2022]. Disponível em: [//www.chemspider.com/](http://www.chemspider.com/)

16. **Chemical Book** - atual. 2016. [Consult. 1 ago. 2022]. Disponível em: <https://www.chemicalbook.com/>

17. VÄLITALO, Pia *et al.* - **Toxicological impacts of antibiotics on aquatic micro-organisms: A mini-review**. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 2017) 558–569.

18. **European Centre for Disease Prevention and Control** - atual. 2022. [Consult. 26 jul. 2022]. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en>

19. PINTO DE ALMEIDA, Luciano; DOMINGUES CARVALHO, Gabriel - **Percepção de Marisqueiros e Maricultores sobre a Existência de Toxinas em Moluscos Bivalves**. Anais do I CoBICET. 2020).

20. MCENEFF, Gillian *et al.* - **The determination of pharmaceutical residues in cooked and uncooked marine bivalves using pressurised liquid extraction , solid-phase extraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry**. Anal Bioanal Chem. 2013) 9509–9521.

21. ALMEIDA, Ângela *et al.* - **Concentrations levels and effects of 17alpha-Ethinylestradiol in freshwater and marine waters and bivalves: A review**. Environmental Research. 2020) 109316.

22. RODRIGUES CAETANO, José; HELENA MARIA GOMES LOURENÇO DOUTOR MIGUEL PEDRO DE FREITAS BARBOSA MOURATO, Doutora - **Contaminação química e microbiológica em lapas (*Patella spp.*) e mexilhão (*Mytilus spp.*)**. Lisboa : [s.n.]

23. JESUS, Cristina De; PEREIRA, França; CRISTINA, Doutora - **Ocorrência de fármacos nos moluscos bivalves : Casos de estudo**. Lisboa : [s.n.]

24. GIL, Maria *et al.* - **Inovação & Tradição para um consumo sustentável**. 1º edição ed. Leiria : [s.n.]. ISBN 9789895339013.

25. FERREIRA DE ALMEIDA FRONTEIRA, Eva - **Atitudes e determinantes de compra, consumo e percepção do risco face aos bivalves**. Leiria : [s.n.]

26. MERCADO, Observatório Europeu Do; AQUICULTURA, Dos Produtos Da Pesca Da - **EUMOFA**, atual. 2022. [Consult. 9 ago. 2022]. Disponível em: <https://www.eumofa.eu/>

27. COSTA, Diogo - **Ensaio para cultivo de amêijoia-macha *Venerupis corrugata* (Gmelin, 1791) e amêijoia-cão *Polititapes aureus* (Gmelin, 1791) em aquacultura**

28. CROVATO, Stefania *et al.* - **From purchase to consumption of bivalve molluscs: A qualitative study on consumers' practices and risk perceptions**. Food Control. 2019) 410–420.

29. NÚÑEZ, Mireia *et al.* - **Determination of pharmaceuticals in bivalves using**

- QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** 2015) 3841–3849.
30. ALVAREZ-MUÑOZ, D. *et al.* - **Multi-residue method for the analysis of pharmaceuticals and some of their metabolites in bivalves.** *Talanta.* 2015) 174–182.
31. ÁLVAREZ-MUÑOZ, D. *et al.* - **Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe.** *Environmental Research.* 2015) 56–64.
32. CHIESA, Luca Maria *et al.* - **Occurrence of antibiotics in mussels and clams from various FAO areas.** *Food Chemistry.* 2018) 16–23.
33. NUNES, Bruno - **A presença de fármacos no ambiente.** *Acta Farmacêutica Portuguesa.* 1 (2011) 43–54.
34. UNION, European - **EUR-Lex**, atual. 2018. [Consult. 5 ago. 2022]. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32019R0006>
35. LACAZE, Emilie *et al.* - **Genotoxic and immunotoxic potential effects of selected psychotropic drugs and antibiotics on blue mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes.** *Environmental Pollution.* 2015) 177–186.
36. STEFFENAK, I.; HORMAZABAL, V.; YNDESTAD, M. - **Effect of Cooking on Residues of the Quinolones Oxolinic Acid and Flumequine in Fish.** *Acta Veterinaria Scandinavica.* 3 (1994) 299–301. doi: 10.1186/BF03548335.
37. ÁLVAREZ-MUÑOZ, Diana *et al.* - **Pharmaceuticals and endocrine disruptors in raw and cooked seafood from European market: Concentrations and human exposure levels.** *Environment International.* 2018) 570–581.
38. UNO, Kazuaki *et al.* - **Pharmacokinetics of oxytetracycline in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and the effect of cooking on the residues.** *Aquaculture.* 2006) 24–31.
39. UNO, Kazuaki *et al.* - **Pharmacokinetics of oxolinic acid in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, and the effect of cooking on residues.** *Aquaculture Research.* 2006) 826–833.
40. PORTZ, Anna Júlia; COUTO, Emanuel Pereira; FERREIRA, Márcia De Aguiar - **Resíduos de antibióticos e qualidade microbiológica de leite cru e beneficiado.** *Revista do Instituto Adolfo Lutz.* 4 (2014) 345–350.
41. MESA - **Mariculture in Tasmania**, atual. 2013. [Consult. 30 abr. 2022]. Disponível em: <http://www.mesa.edu.au/aquaculture/aquaculture20.asp>
42. CAPELA, Marisa Veiga; CAPELA, Jorge M. V - **Elaboração de Gráficos Box-Plot em Planilhas de Cálculo.** *Anais do Congresso de Matemática Aplicada e Computacional.* 2011)

361–364.

43. NETO, José Valladares *et al.* - **Boxplot: Um Recurso Gráfico Para a Análise E Interpretação De Dados Quantitativos** **Boxplot: a Visual Resource for Analysis and Interpretation of Quantitative Data**. Rev. Odontol. Bras. Central. 76 (2017) 1–6.
44. **One-way Anova** - atual. 2017. [Consult. 12 ago. 2022]. Disponível em: <https://statistics.laerd.com/statistical-guides/one-way-anova-statistical-guide.php>
45. ZACH - **Statology**, atual. 2021. [Consult. 12 ago. 2022]. Disponível em: <https://www.statology.org/paired-vs-unpaired-t-test/>
46. HAYES, Adam - **Investopedia**, atual. 2022. [Consult. 6 ago. 2022]. Disponível em: <https://www.investopedia.com/terms/t/two-way-anova.asp>
47. CHU, Libing *et al.* - **Degradation of antibiotics and inactivation of antibiotic resistance genes (ARGs) in Cephalosporin C fermentation residues using ionizing radiation, ozonation and thermal treatment**. Journal of Hazardous Materials. 2020) 121058.
48. MITCHELL, Shannon M. *et al.* - **Hydrolysis of amphenicol and macrolide antibiotics: Chloramphenicol, florfenicol, spiramycin, and tylosin**. Chemosphere. 2015) 504–511.
49. HSIEH, M. K. *et al.* - **Correlation analysis of heat stability of veterinary antibiotics by structural degradation, changes in antimicrobial activity and genotoxicity**. Veterinarni Medicina. 6 (2011) 274–285.
50. LOFTIN, Keith A. *et al.* - **Effects of Ionic Strength, Temperature, and pH on Degradation of Selected Antibiotics**. Journal of Environmental Quality. 2008) 378–386.
51. YUAN, Gao Feng *et al.* - **Effects of different cooking methods on health-promoting compounds of broccoli**. Journal of Zhejiang University: Science B. 8 (2009) 580–588.
52. DIAS, I. N. *et al.* - **Influência Do Ph Na Degradação De Sulfametoxazol E Trimetoprima Por Processo Foto-Fenton Solar Mediado Por Ferrioxalato**. 2015) 1–8.
53. LIN, Hui *et al.* - **Acidic conditions enhance the removal of sulfonamide antibiotics and antibiotic resistance determinants in swine manure**. Environmental Pollution. 2020) 114439.
54. PUTAROVA, Nathalia; GALENDE, Sharize - **Estudo da relação estrutura química e atividade farmacológica dos antibióticos**. Maringá : [s.n.]. ISBN 2013206534.
55. PINTO DA COSTA, Rafaela - **Avaliação da estabilidade do antibiótico macrolídeo tilosina em leite submetido a diferentes condições de processamentos**

térmicos. Rio de Janeiro : [s.n.]. ISBN 9781119130536.

56. HOSSEINI, Mojgan *et al.* - **Degradation of macrolide antibiotics via sono or photo coupled with Fenton methods in the presence of ZnS quantum dots decorated SnO₂ nanosheets.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2018) 24–31.
57. SISMOTTO, Marcela; AUGUSTO, Jonas; PASCHOAL, Rizzato - **Aspectos Analíticos e Regulatórios na Determinação de Resíduos de Macrolídeos em Alimentos de Origem Animal Por Cromatografia Líquida Associada à Espectrometria de Massas.** Quim. Nova. 3 (2013) 449–461.
58. GUL, Saima - **Degradação do antibiótico tetraciclina por vários processos em mistura salina.** São Paulo : [s.n.]
59. GUO, Zhaobing *et al.* - **Radiolytic decomposition of ciprofloxacin using γ irradiation in aqueous solution.** Environmental Science and Pollution Research. 2015) 15772–15780.
60. GONÇALVES, KAIRO HENRIQUE ELIAS - **Estudos de degradação forçada de fármacos fluoroquinolínicos assistida por irradiação micro-ondas.** Goiás : [s.n.]
61. SILVA, JR - **Desenvolvimento De Metodologia Para Eletrodegradação De Ciprofloxacina Por Agentes Oxidantes Gerados in Situ.** São Cristovão : [s.n.]
62. VILA-COSTA, Maria *et al.* - **Degradation of sulfonamides as a microbial resistance mechanism.** Water Research. 2017) 309–317.

Anexos

Anexo I. Pesagens para cada amostra antes e depois da cocção Marinada (bulhão pato), cozer a Vapor e Grelhar na Chapa e o tipo de fortificação que sofreram.

Cocção	Nº Amostra	Lote	Fortificação	Peso antes da cocção (g)	Peso depois da cocção (g)
Marinada (Bulhão Pato)	29	C	B	1,98	1,707
	30	C	B	2,02	1,603
	1	A	B	2,05	1,975
	2	A	LMR	1,95	1,743
	3	A	LMR	2,05	1,758
	4	A	LMR	2,05	1,139
	5	A	2LMR	1,97	1,652
	6	A	2LMR	1,96	1,742
	7	A	2LMR	2,05	1,622
Cozer a Vapor	11	B	B	2	1,3
	12	B	B	2,04	1,334
	13	B	B	2,02	1,486
	14	B	LMR	2,04	1,396
	15	B	LMR	1,95	1,405
	16	B	LMR	2,04	1,669
	36	E	2LMR	2,04	1,52
	37	E	2LMR	2,04	1,421
	38	E	2LMR	2,056	1,5
Grelhar na Chapa	20	C	B	2,04	1,347
	21	C	B	1,99	1,089
	22	C	B	2	1,142
	23	C	LMR	2,01	1,405
	24	C	LMR	1,96	1,318
	25	C	LMR	2	1,1248
	26	C	2LMR	2	1,351
	27	C	2LMR	2,02	1,274
	28	C	2LMR	1,97	1,148

B- Branco, LMR- limite máximo de resíduos, 2LMR-duas vezes o limite máximo de resíduos.

Anexo 2. Valores da percentagem da concentração inicial de todos os antibióticos usados em relação às diferentes fortificações e métodos de coção.

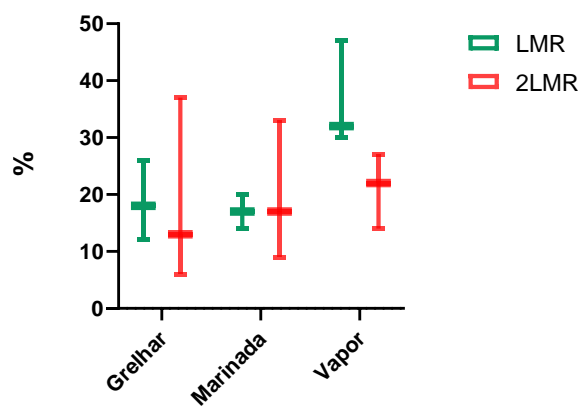
Família	Antibiótico	Ensaio	% da concentração inicial dos antibióticos					
			LMR			2LMR		
			Grelhar	Marinada	Vapor	Grelhar	Marinada	Vapor
Penicilinas	Benzilpenicilina	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0
	Tilmicosina	1	0	0	98	224	115	0
		2	10	0	40	67	54	161
		3	0	0	26	134	0	232
Macrólidos	Trimetoprim	1	82	0	34	201	45	73
		2	81	0	63	102	35	77
		3	130	0	55	139	13	135
	Tilosina A	1	18	14	47	13	17	14
		2	26	20	30	6	33	22
		3	12	17	32	37	9	27
	Sulfaclopiridazina	1	109	43	95	102	34	52
		2	124	39	84	114	27	60
		3	150	64	76	94	23	60
Sulfonamidas	Sulfadiazina	1	87	0	29	203	0	51
		2	110	0	52	132	0	44
		3	122	0	68	147	0	54
	Sulfadimetoxina	1	110	78	113	76	51	54
		2	123	67	98	113	47	61
		3	158	122	88	80	43	63

Família	Antibiótico	Ensaio	% da concentração inicial dos antibióticos					
			LMR			2LMR		
			Grelhar	Marinada	Vapor	Grelhar	Marinada	Vapor
Sulfonamidas	Sulfadimidina	1	81	0	73	187	10	72
		2	101	0	48	140	0	68
		3	132	0	93	129	0	67
	Sulfadoxina	1	56	9	72	127	36	36
		2	68	0	49	107	41	50
		3	97	0	55	88	17	45
	Sulfametizol	1	144	51	80	134	37	58
		2	162	42	93	137	36	57
		3	187	69	101	120	26	74
Sulfametoxazol	1	89	56	101	100	47	47	
	2	105	46	83	107	44	59	
	3	132	74	81	81	36	58	
Sulfapiridina	1	107	0	71	192	5	70	
	2	119	0	54	148	15	59	
	3	153	0	80	147	0	61	
Sulfaquinoxalina	1	100	75	101	60	44	48	
	2	109	67	90	93	38	51	
	3	135	116	80	69	38	55	
Sulfatiazol	1	186	92	142	153	54	93	
	2	197	92	147	131	54	88	
	3	234	134	145	146	52	96	
Sulfisomidina	1	42	0	61	152	3	30	
	2	38	0	24	100	17	39	
	3	74	0	48	92	0	18	
Sulfisoxazol	1	77	43	95	80	37	43	
	2	97	37	67	98	38	56	
	3	95	42	67	73	31	48	

Família	Antibiótico	Ensaio	% da concentração inicial dos antibióticos					
			LMR			2LMR		
			Grelhar	Marinada	Vapor	Grelhar	Marinada	Vapor
Quinolonas	Cinoxacina	1	57	99	74	94	116	30
		2	71	64	69	53	110	48
		3	100	87	53	63	89	57
	Ciprofloxacina	1	67	30	25	114	67	32
		2	85	7	52	46	56	37
		3	115	8	26	58	30	82
	Danofloxacina	1	112	62	88	137	67	53
		2	143	52	117	73	60	62
		3	176	76	95	95	45	95
Enoxacina	1	62	25	17	147	99	47	
	2	83	0	59	45	66	49	
	3	128	0	8	63	33	122	
Enrofloxacina	1	12	0	6	159	37	45	
	2	36	0	11	37	9	45	
	3	51	0	26	70	0	142	
Flumequina	1	113	94	94	99	89	52	
	2	121	73	73	93	86	64	
	3	149	120	120	84	70	71	
Marbofloxacina	1	41	0	28	143	48	39	
	2	85	0	30	54	29	37	
	3	77	0	15	78	9	99	
Ácido Nalidíxico	1	72	61	86	104	86	38	
	2	80	40	75	77	89	57	
	3	114	67	69	80	66	56	
Norfloxacina	1	78	18	29	118	59	38	
	2	95	0	68	53	42	47	
	3	134	3	31	65	29	91	

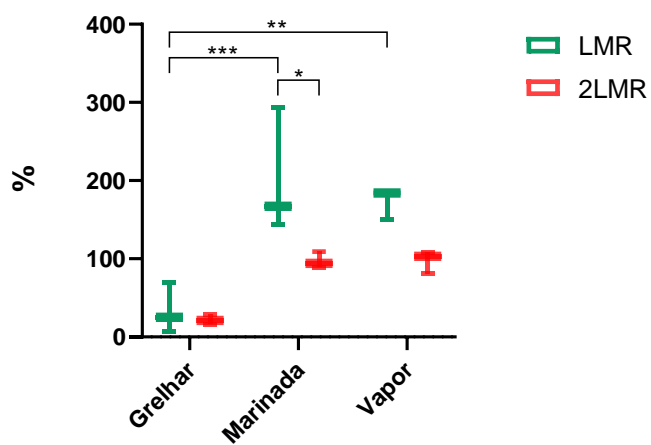
Família	Antibiótico	Ensaio	% da concentração inicial dos antibióticos						
			LMR			2LMR			
			Grelhar	Marinada	Vapor	Grelhar	Marinada	Vapor	
Quinolonas	Ofloxacina	1	110	28	67	176	56	62	
		2	126	0	93	75	39	57	
		3	160	0	71	110	27	113	
	Ácido Oxolínico	1	63	45	92	93	69	40	
		2	75	27	69	66	60	61	
		3	105	50	70	73	48	67	
	Tetraciclinas	Clorotetraciclina	1	87	22	88	131	53	25
			2	94	6	47	48	44	36
			3	123	41	56	92	31	44
Doxiciclina		1	7	167	184	21	109	81	
		2	25	144	184	16	89	103	
		3	69	293	150	29	94	108	
Epi-clorotetraciclina		1	0	33	0	117	97	0	
		2	9	0	25	44	92	1	
		3	41	0	6	27	66	47	
Epi-Tetraciclina	1	134	303	78	133	202	21		
	2	175	150	85	77	244	36		
	3	147	359	42	80	195	62		
Oxitetraciclina	1	8	0	0	114	115	0		
	2	55	0	0	0	71	0		
	3	6	0	0	13	77	26		
Tetraciclina	1	85	34	57	166	97	16		
	2	88	0	11	52	82	24		
	3	88	84	14	99	42	86		

Tilosina A

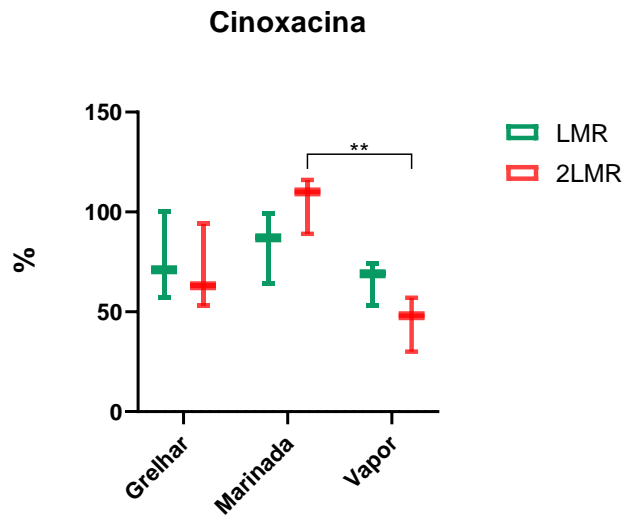


Anexo 3. Percentagem da concentração inicial de tilosina A após os três métodos de cocção.

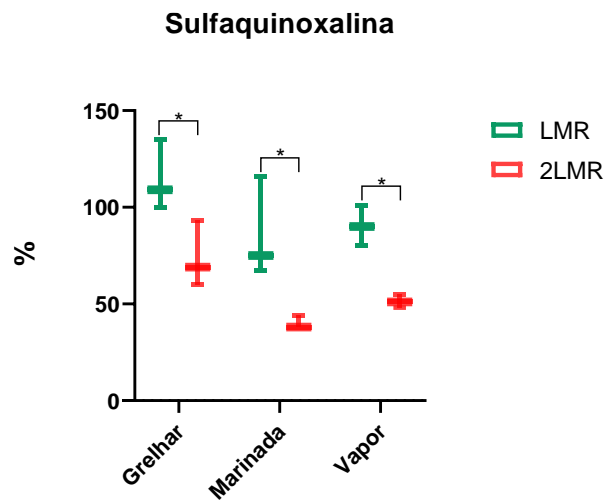
Doxiciclina



Anexo 4. Percentagem da concentração inicial de doxiciclina após os três métodos de cocção.



Anexo 5. Percentagem da concentração inicial de cinoxacina após os três métodos de cocção.



Anexo 6. Percentagem da concentração inicial de sulfaquinoxalina após os três métodos de cocção.